FACULTÉ DE MÉDECINE D'ANGERS

IMMUNOLOGIE

cours

PCEM II

2003-2004

PROFESSEUR JEANNIN
DOCTEUR CHEVAILLER
DOCTEUR RENIER
DOCTEUR MCILROY

Ce document pédagogique sert de référence aux cours faits en amphithéâtre. Dans sa version définitive, il sera disponible en ligne sur le site de la Faculté.

Chaque cours est construit selon le même schéma :

- sont d'abord définis les **objectifs pédagogiques**, classés en trois niveaux :
  - A : indispensables
  - B : à savoir
  - C : pour la compréhension
- la **typographie** du document se calque sur les objectifs :
  - les objectifs de niveau A sont en gras
  - ceux de niveau B sont en caractères de taille et de style normaux
  - enfin ceux de niveau C apparaissent en petits caractères et en italique. Une notion ou un concept peuvent être introduits, ou juste cités, en italique dans un premier cours, puis être totalement explicités ultérieurement en caractères normaux dans un cours suivant.
- Le cours est suivi d'un **résumé,** de **références bibliographiques** et de **QCM**

Il est fortement recommandé de lire le chapitre correspondant avant de venir en cours : celui-ci sera illustré (diapositives,transparent ou diaporama) et dans la mesure du possible le polycopié des illustrations sera distribué le jour même

Programme 2003-2004

date	heures	cours	intervenant
Lundi 09 février 2004	16h15 - 18h15	Introduction (1h) et Antigène (1h)	P Jeannin
Mercredi 11 février 2004	16h15 - 18h15	Organes de l'immunité (1h) immunorécepteurs (1h)	A Chevailler
Lundi 08 mars 2004	16h15 - 18h15	Système HLA	G Renier
Mercredi 10 mars 2004	16h15 - 18h15	Cellules de l'immunité	P Jeannin
Mercredi 17 mars 2004	16h15 - 18h15	Immunité naturelle (1h) Cytokines (1h)	P Jeannin
Lundi 22 mars 2002	16h15 - 18h15	immunoglobulines	A Chevailler
Mercredi 24 mars 2004	16h15 - 18h15	BCR, différenciation B (1h) et complément (1h)	A Chevailler
Mercredi 31 mars 2004	16h15 - 18h15	TCR, différenciation T	A Chevailler
Lundi 26 avril 2004	16h15 - 18h15	Lymphocytes T effecteurs et régulateurs	A McIlroy
Mercredi 28 avril 2004	16h15 - 18h15	Exploration biologique	A Chevailler
Lundi 03 mai 2004	16h - 18h	Cours transversal	A Chevailler

SOMMAIRE

Préface	page 4
Introduction	page 6
Antigènes	page 27
Organes de l'immunité	page 49
Immunorécepteurs	page 76
Système HLA	page 88
Cellules de l'immunité	page 104
Cytokines et chimiokines	page 151
Immunité naturelle	page 178
Immunogobulines	page 195
BCR et différenciation B	page 247
Complément	page 269
TCR	page 295
différenciation T	page 309
Lymphocytes T effecteurs	page 321
Explorations en immunologie	page 343

PRÉFACE : IMMUNOLOGIE 2000

Docteur Alain CHEVAILLER

Article paru dans la *Revue Française des Laboratoires* 2000, **319** : 14.

PRÉSENTATION DE LA DISCIPLINE

L'immunologie est une discipline qui étudie, en physiologie et en pathologie, le fonctionnement du système immunitaire, les propriétés de ses effecteurs et de leurs cibles, in vivo et in vitro, leurs applications de ces dernières en biotechnologie, et les moyens de les stimuler ou de les réprimer [1].

CE QU'A APPORTÉ LE XX^{E} SIÈCLE A LA DISCIPLINE

Après les prémisses de l'ère pastorienne à la fin du siècle dernier qui avait vu l'immunologie émerger de la microbiologie en rationalisant la découverte de la vaccination de Jenner, le XX^{e} siècle a été celui de l'établissement de cette science nouvelle par la définition de son objet d'étude : le système immunitaire [2]. Dans un va-et-vient incessant entre pratique expérimentale et pratique théorique, l'immunologie s'est constituée successivement autour des paradigmes défensif (réponse anti-infectieuse), puis sélectif (sélection clonale) et enfin cognitif (distinction soi/non-soi) [3]. Saluées par 15 prix Nobel, ses interrogations ont permis et se sont nourries de la mise au point d'outils qui ont révolutionné et la pratique médicale, et le champ d'investigation d'autres disciplines scientifiques : des succès de la vaccination à celui des greffes, de la structure des immunoglobulines à la mécanique recombinatoire génique créatrice de diversité, les exemples sont nombreux de l'apport fondamental de l'immunologie aux progrès des connaissances biologiques. Sans théorie de la sélection clonale de Burnet, pas d'anticorps monoclonaux de Köhler et Milstein dont la présence, désormais triviale dans les méthodes diagnostiques, voire thérapeutiques, se retrouve dans ce terme d'immuno-analyse qui laisse à penser que tout biologiste, tel Monsieur Jourdain, fait de l'immunologie sans le savoir.

LE TOURNANT 2000

Discipline mixte, fondamentale et clinique, l'immunologie regroupe des professionnels d'horizons différents : scientifique, médical, pharmaceutique, odontologique et vétérinaire. Cette richesse d'angles de vue n'en est une que si l'on maintient l'unicité d'une vision globale apportée par la connaissance détaillée de la physiopathologie du système immunitaire. Si le territoire de l'immunologie fondamentale est peu ou prou reconnu, celui de l'immunologie médicale est encore en pleine évolution [4].

Au terme de ce siècle, le mode de fonctionnement du système immunitaire commence à être mieux perçu, grâce aux progrès de l'immunologie fondamentale. Le système immunitaire, contrairement aux autres appareils de l'organisme, tels que les appareils cardio-vasculaire ou locomoteur par exemple, n'a pas d'individualité anatomique et temporelle stricte. Il est constitué d'un ensemble de cellules qui se répartissent entre différents compartiments : organes lymphoïdes proprement dits (thymus, moelle osseuse, rate, ganglions), voies de circulation (sang, lymphe) et autres tissus non lymphoïdes. On peut cependant le concevoir comme un réseau d'opérateurs traitant des informations et possédant une branche afférente de reconnaissance d'antigènes identifiés comme potentiellement agressifs, et une branche efférente effectrice, d'élimination de ces antigènes. L'immunologie, en cela, ressemble à la cybernétique, puisqu'il y est question de communication et de langage [5]. L'importance des mécanismes de recombinaison génique dans la création des répertoires B et T, des mécanismes d'apoptose dans l'établissement de la tolérance et l'obtention de la cytotoxicité [6], des mécanismes de présentation des antigènes par les cellules dendritiques, des mécanismes de communication cellulaire par les cytokines est désormais bien établie. D'une meilleure connaissance de tous ces processus découlera une meilleure compréhension de pathologies dans lesquelles sont impliqués des dysfonctionnements de ces différents phénomènes.

L'immunologie médicale [1] est une discipline mixte, biologique et clinique, dont l'objet est le diagnostic et la prise en charge de maladies à physiopathologie dysimmunitaire. Ces maladies peuvent être regroupées en sept grandes thématiques : les maladies auto-immunes, l'immunologie de transplantation d'organes et de greffe de tissus, les déficits immunitaires primitifs, le SIDA et les infections des immunodéprimés, les syndromes lymphoprolifératifs et les cancers, l'immunothérapie et les vaccinations, les

hypersensibilités et les maladies allergiques. L'interprétation des explorations effectuées dans les laboratoires de biologie requière une grande expertise technique ainsi qu'une parfaite collaboration clinico-biologique.

LES ESPOIRS POUR LES 20 PREMIERES ANNEES DU XXI^{E} SIECLE

Discipline transversale s'il en est, l'immunologie se voit au défi, à l'aube du XXI^{e} siècle, de définir encore mieux son champ d'investigation, tout en validant l'opérationnalité des nouveaux concepts qu'elle élabore, par l'émergence de stratégies thérapeutiques innovantes. Celles-ci devront être dirigées, entre autres, contre deux défis majeurs (paludisme, SIDA) qui, tel le retour du refoulé de Freud, l'ont renvoyée, un siècle après, à ses origines infectieuses. L'immunologie est en cela comparable au pudding d'Engels dont l'affirmation otonlogique réside dans le fait qu'on le mange : les nouveaux concepts de l'immunologie expérimentale sont à valider par les progrès thérapeutiques qu'ils sont capables d'engendrer. L'enjeu est désormais de se soustraire au modèle réductionniste moléculaire pour remonter du gène à la protéine et à sa fonction, non seulement dans la cellule, mais surtout dans l'organisme. Une meilleure connaissance des processus d'établissement du répertoire des lymphocytes T et B, de la présentation des antigènes par les cellules dendritiques, des mécanismes d'apoptose, devrait engendrer des progrès dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique de pathologies aussi diverses que les infections, les maladies auto-immunes, les greffes, les déficits immunitaires, l'athérosclérose et certains cancers.

RÉFÉRENCES

[1] *Le Livre Blanc de l'Immunologie Médicale* Société Française d'Immunologie, **1996** http : // www.inserm.fr/sfi

[2] DAËRON M *Le système immunitaire ou l'immunité cent ans après Pasteur* INSERM/Nathan Paris **1995**

[3] MOULIN AM Clés pour l'histoire de l'immunologie in DAËRON M *Le système immunitaire ou l'immunité cent ans après Pasteur* INSERM/Nathan Paris **1995** : 121-9

[4] EFIS (European Federation of Immunological Societies) Position paper. EFIC-CIG home page in http://www.efis.org

[5] MOULIN AM *Le dernier langage de la Médecine. Histoire de l'immunologie de Pasteur au SIDA*. PUF, Paris, **1991**

[6] AMEISEN JC *La sculpture du vivant. Le suicide cellulaire ou la mort créatrice.* Le Seuil, Paris, **1999**

INTRODUCTION À L'IMMUNOLOGIE

I DÉFINITIONS

II HISTORIQUE

III MISE EN PLACE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

III -1 Les deux types d'immunité.

III -2 La theorie de la sélection clonale.

III -3 Le lymphocyte.

III -4 Le récepteur de l'antigène.

III -5 La tolerance.

III -6 La circulation des lymphocytes.

III -7 Le deuxième signal.

III -8 Le système immunitaire en action.

III -9 Les anticorps, produits du lymphocyte B.

III -10 Les lymphocytes T.

III -11 La restriction par le complexe majeur d'histocompatibilite.

III-12 Immunité naturelle et immunité acquise.

III-13 La mémoire immunologique.

III-14 La mise en jeu de la reponse immunitaire.

III - 14 - 1 - la théorie du danger
III - 14 - 2 - la théorie infectieuse
III - 14 - 3 - la théorie du rôle central de l'antigène

III-15 Le système immunitaire en pathologie.

INTRODUCTION À L'IMMUNOLOGIE : OBJECTIFS

Par définition, dans ce cours introductif, qui peut aussi se lire comme un cours final de révision, ce sont les concepts fondamentaux, donc de niveau A, qui sont exposés.

Niveau A :

- **Distinction immunité naturelle/adaptative**
- **Lymphocyte support de l'immunité adaptative**
- **immunorécepteur**
- **spécificité, mémoire de l'immunité adaptative**
- **sélection clonale**
- **organes lymphoïdes primaires/secondaires**
- **tolérance**
- **cytokines**
- **co-stimulation**
- **cellule présentatrice d'antigène**
- **complexe majeur d'histocompatibilité**
- **restriction par le CMH (II/CD4, I/CD8)**
- **mode de reconnaissance antigènique distinct entre lymphocytes T et B**
- **réponse primaire/secondaire**
- **inflammation**
- **classification de Gell et Coombs**

Niveau B :

- **immunopathologie**
- **classification de Gell et Coombs**
- **3 théories (danger, infectieuse, antigène)**
- **vaccination**

INTRODUCTION À L'IMMUNOLOGIE

I - DÉFINITIONS

L'Immunologie est **la science de l'immunité**.

L'Immunologie est une vaste discipline qui étudie, en physiologie et en pathologie, le fonctionnement du système immunitaire, les propriétés de ses effecteurs et de leurs cibles in vIIIo et in vitro, les applications de ces derniers en biotechnologie, et les moyens de les stimuler ou de les réprimer.

L'immunité est **l'état de protection de l'individu vis-à-vis d'agressions étrangères** notamment microbiennes, parasitaires, mycotiques. C'est la définition classique de cette discipline.

Actuellement on préfère une définition plus large, qui considère l'immunologie comme la science de la **discrimination du soi (self) et du non-soi (non-self)**.

Cette immunité est dite **active**, lorsque l'individu a produit lui-même ses effecteurs après contact avec l'agresseur, et **passive** lorsque ces effecteurs lui ont été transmis physiologiquement (grossesse) ou artificiellement (sérothérapie).

L'immunité peut donc être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme pluricellulaire de maintenir la cohérence de ses cellules et tissus et d'assurer son intégrité en éliminant ses propres constituants altérés et les substances étrangères auxquelles il est exposé (infection, greffe, allergène, etc...)

Les réactions immunitaires ne sont pas toujours bénéfiques : elles peuvent entraîner des réactions d'**hypersensibilités** (voir III-15), telle que l'anaphylaxie, ou se retourner contre les propres constituants de l'organisme et être alors responsables de maladies dites **auto-immunes.**

Le système immunitaire, contrairement aux autres appareils de l'organisme, tels que les appareils cardio-vasculaire ou locomoteur par exemple, n'a pas d'individualité anatomique ou temporelle stricte. Il est constitué d'un ensemble de cellules qui se répartissent entre différents compartiments : organes lymphoïdes proprement dits (thymus, rate, ganglions par exemple), voies de circulation (lymphe, sang) et autres tissus non lymphoïdes.

On peut cependant le concevoir comme un réseau d'opérateurs, traitant des informations et possédant une branche **afférente** de **reconnaissance de l'antigène**, et une branche **efférente**, effectrice, d'**élimination de l'antigène**.

Le traitement de l'information entre les différents acteurs cellulaires du système immunitaire peut se faire selon deux modes :

- **contact cellulaire direct** par des interactions spécifiques entre des couples ligand/récepteur (exemple : CD28/B7, CD40/CD40L, Fas/FasL, etc...)
- interaction spécifique **médiateur/récepteur** (exemple : antigène/récepteur d'antigène [TCR ou immunoglobuline], cytokine/récepteur de cytokine, etc...).

L'interaction antigène/récepteur d'antigène repose à l'échelon moléculaire sur des processus de reconnaissance stéréospécifique survenant à la surface des cellules immunocompétentes et font intervenir des mécanismes d'amplification en cascade (exemple : système du complément), et des phénomènes d'actIIIation de l'expression de certains gènes cellulaires, de division, de différenciation et de migration cellulaire.

L'immunité spécifique est induite par un premier contact avec l'antigène. Elle se caractérise par deux propriétés fondamentales : la **spécificité** de la réponse immunitaire et la

mémoire immunologique. Ce contact entraîne la prolifération des seuls lymphocytes T et B porteurs des récepteurs spécifiques de l'antigène. Cette **expansion clonale** est à l'origine du phénomène de mémoire immunologique. La spécificité, ou capacité de distinguer une molécule parmi des milliards de molécules d'antigènes existant dans la nature, voire artificielles, implique un considérable **polymorphisme** des molécules d'anticorps et de TCR au sein d'un organisme.

II - HISTORIQUE

*Immunologie vient du latin **immunitas** qui désignait l'exemption de charges accordée aux sénateurs romains, soustraits au droit commun.*

Appliqué à la médecine, il désigne l'état de protection spécifique d'une maladie conféré aux survIIIants d'une épidémie: la première description de ce phénomène remonte à THUCYDIDES dans sa description de la peste qui ravagea Athènes au Vème siècle avant Jésus-Christ.

*Bien avant que l'on ne soupçonne le mode de fonctionnement du système immunitaire, on a été capable de le manipuler à des fins thérapeutiques. Dès le Xème siècle les Chinois de la dynastie Ming étaient capables de conférer une protection contre la variole par inhalation de poudre de lésions croûteuses varioliques. Ce procédé de **variolisation** suIIIi la route de la soie et fut ramené de Turquie en Europe par la femme d'un ambassadeur anglais, Lady MONTAGU, vers 1722. Il avait pour inconvénient d'induire une maladie réelle au patient. Un médecin anglais, **Edward JENNER**, qui l'employa, constata que les garçons vachers qui s'occupaient du bétail, ne répondaient pas à la variolisation. Il fit l'hypothèse que cette absence de réponse était due à l'existence d'une maladie bovine, la vaccine, ressemblant à la variole humaine, mais responsable d'une maladie bénigne chez l'homme. Cela lui donna l'idée d'inoculer, en mai 1796, des pustules de vaccine à un petit garçon pour ainsi immuniser un humain au moyen d'une maladie bénigne afin de le protéger contre une beaucoup plus grave. Le procédé prit le nom de **vaccination**. Il désigne l'inoculation de sujets sains avec une souche atténuée d'un agent pathogène pour les protéger de la maladie due à cet agent. Dans le cas particulier de la variole, l'immunologie peut être créditée d'un succès sans précédent, puisqu'en 1980, l'OMS a pu annoncer l'éradication planétaire de la variole grâce à sa campagne de vaccination.*

*Après cet événement fondateur qu'est la découverte de JENNER il y a deux siècles, l'Immunologie n'a acquis que tardIIIement ses lettres de noblesse, ayant à individualiser son objet d'étude, le **système immunitaire**, de ceux des autres sciences existantes, et principalement de la microbiologie. Ses connaissances ont évolué au gré des progrès technologiques par une incessante confrontation entre des données expérimentales, fruits des hypothèses, et des données cliniques.*

On peut lui décrire cinq périodes, certaines se chevauchant, toutes jalonnées par l'attribution de prix Nobel à certaines des observations fondatrices, 15 au total. La dernière en date, en 1996, récompense l'apport du Suisse ZINKERNAGEL et de l'Australien DOHERTY à la compréhension du fonctionnement de l'immunité cellulaire.

*La première période peut être qualifiée de **microbiologique**: il y a tout juste un siècle, l'immunologie s'individualise de la microbiologie grâce aux travaux de PASTEUR sur la rage (1895) qui concluent toute une série de manipulations bénéfiques de la réponse immunitaire par les vaccinations. Mais déjà à cette époque on a été capable de soupçonner que ce système immunitaire, en principe dévolu à la protection de l'indIIIidu contre les microorganismes pathogènes, pouvait dans des circonstances anormales de fonctionnement être délétère: c'est la découverte de l'anaphylaxie par PORTIER et RICHET en 1902.*

*L'ère pastorienne sera la deuxième époque, **sérologique**, au tournant du siècle où les théories s'échafauderont à partir de la pratique expérimentale de la vaccination. Dans les dix dernières années du siècle seront décrits l'agglutination par GRUBER et DURHAM, la précipitation par KRAUS et le complément par BORDET. Deux théories s'opposeront violemment quant à la nature de la réponse immunitaire: partisans d'une réponse purement humorale, derrière VON BEHRING et KITASATO, qui retrouvaient dans le sérum des personnes immunisées des substances capables de se lier au pathogène immunisant et qu'ils appelaient anticorps, et partisans d'une réponse purement cellulaire avec METCHNIKOFF et ses travaux sur la phagocytose. Le point d'orgue de cette période peut se voir dans la théorie d'EHRLICH qui opérait en 1897 une synthèse hardie et prémonitoire de ces deux visions opposées, pressentant la dualité fonctionnelle de la réponse immunitaire, humorale et cellulaire.*

*La troisième époque, que l'on peut qualifier d'**immunochimique**, et qui s'étend grossièrement sur la première moitié du siècle, s'est entièrement focalisée sur la réponse humorale et a disséqué, grâce aux progrès des techniques biochimiques, la nature de la réponse antigène-anticorps. On peut citer comme étapes la définition de l'haptène par LANDSTEINER en 1917, l'identification de la nature immunoglobulinique des anticorps par KABAT en 1938 grâce à l'électrophorèse des protéines nouvellement mise au point par TISÉLIUS, la mise au point de la réaction d'immunofluorescence par COONS en 1942, celle de l'immunodiffusion radiale par OUDIN et OUCHTERLONY en 1946, celle de l'immunoélectrophorèse par GRABAR et WILLIAMS en 1953 pour aboutir enfin en*

1959, grâce aux toutes nouvelles possibilités de séquençage des protéines, a la structure des immunoglobulines par PORTER et EDELMAN.

*La quatrième époque est celle de l'**immunologie cellulaire**. Bien que ses prémisses remontent à la fondation de l'immunologie moderne avec les travaux de METCHNIKOFF sur la phagocytose et ceux de Robert KOCH en 1890 faisant la preuve du rôle direct causal des micro-organismes dans les maladies infectieuses et décrIIIant la réponse cellulaire de l'organisme à ces derniers, l'immunologie cellulaire vécut une éclipse pendant la première moitié du siècle où l'étude de l'immunité humorale triomphait. Il fallut attendre 1959 et la reconnaissance par GOWANS du rôle des lymphocytes dans la réponse immunitaire, suite à des travaux de déplétion chez le rat, pour que les travaux explosent dans ce domaine: reconnaissance dans les années cinquante par MACKANESS que la résistance à Listeria monocytogenes ne peut être obtenue que par le transfert des cellules et pas du sérum, description du rôle du thymus par MILLER en 1960, description de l'ontogénèse B dans la bourse de Fabricius par GOOD en 1962.*

*Dernière en date, la cinquième période est celle de l'**immunogénétique** et se poursuit actuellement grâce aux progrès des outils de la biologie moléculaire par ce que l'on peut appeler l'**immunologie moléculaire**. Inaugurée au début du siècle par les travaux de LANDSTEINER sur les groupes sanguins ABO (1900) et Rhésus (1940), elle est fondée dans les années 1960 par la description du système d'histocompatibilté HLA par DAUSSET et VAN ROOJ (1958-62), celle par BENACERRAF des gènes de réponse immunitaire (1963) dont le fonctionnement est expliqué par la description du phénomène de restriction H2 par ZINKERNAGEL et DOHERTY en 1974. Enfin elle permet d'apporter une réponse à la question irritante de la dIIIersité du répertoire immunologique, d'abord par la description des gènes des immunoglobulines due à TONEGAWA en 1975, puis à celle du récepteur T de l'antigène (TCR) par DAVIS et MARK en 1984.*

III - MISE EN PLACE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

III -1 - LES DEUX TYPES D'IMMUNITÉ.

La réponse immunitaire fait intervenir deux types de mécanismes qui sont d'apparitions successives au cours de l'évolution des espèces et sont intimement connectés chez les organismes supérieurs : **l'immunité naturelle non spécifique** et **l'immunité acquise spécifique adaptative.**

L'immunité **naturelle**, encore appelée **innée** ou **naïve**, repose sur une distinction globale du soi et du non-soi. C'est une réponse **immédiate**, **non spécifique** de l'agresseur et **non adaptative**.

L'immunité **acquise** spécifique est apparue il y a environ 500 millions d'années avec l'apparition des premiers vertébrés. Cette réponse est **spécifique** de l'antigène, **adaptative**, **limitée** dans le temps à l'éradication de l'agresseur dont elle garde la **mémoire**. Ses mécanismes effecteurs se répartissent entre une **réponse humorale** et une **réponse cellulaire**. L'**antigène** a ainsi été appelé initialement en référence à sa capacité *gén*ératrice d'*anti*corps. La notion est désormais étendue à toutes les molécules capables de stimuler aussi bien la réponse humorale que la réponse cellulaire.

III - 2 - LA THEORIE DE LA SÉLECTION CLONALE.

F MACFARLANE BURNET (1956) explique la spécificité de l'immunité acquise par la préexistence dans l'organisme de précurseurs des cellules productrices d'anticorps, chaque cellule ne produisant qu'un type donné d'anticorps et portant à sa surface cette immunoglobuline qui y fonctionne comme un récepteur d'antigène.

Au sein de la population globale des lymphocytes, capable de reconnaître la totalité des antigènes potentiellement reconnaissables et définissant le **répertoire** immunologique, chaque spécificité n'est représentée que par quelques cellules portant un récepteur clonotypique (voir cours sur *les immunorécepteurs*) avec le même site de liaison pour un antigène donné, issues d'une même cellule ancêtre et formant un **clone**.

Une cellule reste au repos, ou quiescente, jusqu'à ce qu'elle rencontre son antigène et le lie: cette liaison l'active et la fait proliférer, donnant naissance à de nombreuses cellules

filles identiques, capables de se différencier soit en **cellules effectrices** dévolues à l'éradication de l'antigène et disparaissant après éradication de l'agresseur par apoptose, soit en **cellules mémoire** dont la fonction est d'attendre une nouvelle rencontre avec l'antigène spécifique pour mettre en place une réponse adaptée plus précoce, définissant ainsi la **mémoire** immunologique. La résultante en est l'élimination sans symptôme visible du pathogène par une prolifération et une différenciation immédiate de ces cellules mémoire.

Cette expansion clonale, résultant d'une intense prolifération cellulaire, peut, dans certaines infections virales aiguës, multiplier le taux basal (non stimulé) des lymphocytes spécifiques par un facteur x10^5.

*Cette théorie de la **sélection clonale**, désormais prouvée, invalidait l'ancienne théorie, dite **adaptatIIIe**, qui présupposait que l'antigène était capable d'imprimer sa forme sur un récepteur cellulaire indifférencié qui en gardait définitIIIement l'empreinte tel un moule. Elle ne résolvait pas, par contre, le problème de la dIIIersité des anticorps auquel la génétique a apporté une réponse.*

III-3 Le lymphocyte.

Vers la fin des années 1950, Gowans a identifié la cellule support de l'immunité comme étant le **lymphocyte**. Chaque lymphocyte ne porte qu'un seul type de récepteur (clonotypique), d'où le terme de **monospécificité**.

En cas contraire, de lymphocyte à plusieurs spécificités, la réponse immunitaire à un antigène donné dégénérerait en s'étendant à des antigènes "innocents". Cette spécificité a un support génétique que nous reverrons.

Le lymphocyte sera étudié dans le cours sur *les cellules de l'immunité*.

III - 4 - Le récepteur de l'antigène.

Au cours de son processus de maturation chaque lymphocyte crée un récepteur unique par une mécanique **recombinatoire** génétique.

Cette acquisition se fait dans les **organes lymphoïdes primaires**, que sont la **moelle osseuse** pour les **lymphocytes B**, et le **thymus** pour les **lymphocytes T**, au hasard et en absence de l'antigène (voir cours sur *les organes de l'immunite*).

*C'est le mérite de Tonegawa d'avoir montré en 1976, dans le cas des gènes des immunoglobulines du lymphocyte B comment la dIIIersité des anticorps était obtenue. A l'époque la structure des immunoglobulines était connue avec l'existence de **domaines** variables et constants sur les deux chaînes lourdes et légères. Tonegawa montra que le gène codant pour le fragment variable résultait du rapprochement au hasard de plusieurs segments éclatés dans le génome.*

Il y a 400 millions d'année, un gène transposon, qui s'est rapidement dupliqué, s'est inserré dans un gène codant pour un récepteur membranaire chez un vertébré primitif. Ces gènes sont les gènes RAG1 et RAG2 ("recombinase activating gene") qui jouent un rôle crucial dans l'obtention de la dIIIersité des immunorécepteurs exprimés à la surface des lymphocytes T et B. La résultante en est l'obtention de clones de lymphocytes spécifiques d'un antigène donné, cependant recrutables avec un certain délai (une à deux semaines), mais gardant la mémoire du premier contact avec leur antigène spécifique.

Ce mécanisme a trois conséquences importantes:

- un nombre **limité de gènes** est capable de créer une grande **diversité d'anticorps.**
- un réarrangement donné est **propre** à une cellule, ce qui explique la **spécificité**.
- un réarrangement est **irréversible**: toutes les cellules filles en hériteront.

Le même processus s'applique au lymphocyte T dont le récepteur pour l'antigène s'appelle le **TCR** (voir cours spécifique).

Qu'il soit T ou qu'il soit B, le récepteur de l'antigène résulte de l'association de deux chaînes qui participent toutes les deux à la formation du site de liaison: ceci introduit un nIIIeau supplémentaire de dIIIersité, dite **combinatoire**. Ainsi donc un très petit nombre de gènes est capable de créer une importante diversité de récepteurs: on compte environ 10^9 à 10^{11} lymphocytes différents chez un indvidu, capables de reconnaître autant de motifs antigéniques différents : l'ensemble de ces récepteurs constitue ce que l'on appelle le **répertoire**. Nous verrons qu'il existe un **répertoire B** et un **répertoire T.**

III - 5 - La tolerance.

Les lymphocytes porteurs de récepteurs pour les antigènes du soi sont éliminés pendant le développement. La recombinaison au hasard crée forcément des récepteurs capables de reconnaître les antigènes du soi et donc précurseurs potentiels d'une réponse dirigée contre nos propres tissus. Or ce n'est pas la règle: on ne réagit pas contre ses propres tissus. Ce phénomène est appelé **tolérance** au soi.

En 1953 Peter Medawar montre que des animaux exposés à des tissus étrangers au cours de leur développement embryonnaire développent à l'âge adulte un état de tolérance spécifique lors de greffe avec ces mêmes tissus.

Burnet dans sa théorie de la sélection clonale explique ce phénomène par l'élimination des clones auto-réactifs au cours de l'éducation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes primaires. La liaison d'un antigène du soi à un récepteur conduit à la mort du lymphocyte par un mécanisme que nous verrons ultérieurement. Cette tolérance est dite **centrale** car elle ne vaut que pour les antigènes du soi exprimés dans les organes lymphoïdes primaires. D'autres mécanismes, dits de tolérance **périphérique**, sont en jeu pour les antigènes du soi uniquement exprimés en périphérie.

Les postulats de la tolérance sont donc les suivants:

- chaque lymphocyte ne porte qu'un seul type de récepteur présentant une spécificité unique

- l'interaction entre l'antigène et son récepteur spécifique exprimé à la surface du lymphocyte entraîne l'actIIIation de ce dernier

- les cellules filles effectrices différenciées issues du lymphocyte activé portent un récepteur de spécificité identique à celui de la cellule mère: elles constituent un clone

- les lymphocytes porteurs de récepteur spécifique du soi sont éliminés lors de leur développement et sont donc absents du répertoire des lymphocytes matures.

III - 6 - La circulation des lymphocytes.

Nous avons vu que la recirculation des lymphocytes est la propriété fondamentale qui permet à un clone lymphocytaire, faiblement représenté et noyé dans la masse de tous les autres lymphocytes naïfs, de rencontrer son antigène spécifique, dont la porte d'entrée peut en outre être très variable.

Cette circulation se fait des organes lymphoïdes primaires vers les organes lymphoïdes secondaires via le sang, et des organes lymphoïdes secondaires vers le sang via les vaisseaux lymphatiques. Les lymphocytes, porteurs de récepteurs spécifiques, sont attirés (**chimiotaxie**) par des substances (chimiokines) émises à partir des tissus. Le passage du sang vers les tissus lymphoïdes, ou **diapédèse**, se fait grâce à des molécules d'adressage (ou adressines), exprimés sur les lymphocytes, capables de se lier à des ligands spécifiques à la surface des cellules endothéliales. L'existence d'un phénotype précis choisis parmi ces deux ensembles de molécules membranaires explique la spécificité de l'adressage des cellues immunocompétentes (voir cours sur *les organes de l'immunité*).

Le développement des organes lymphoïdes secondaires est conditionné par la présence des antigènes : des animaux élevés en condition axéniques (dans un environnement dépourvu de germes et avec des aliments stérilisés) ont une atrophie de leurs organes lymphoïdes secondaires.

Bien que de morphologie différente les organes lymphoïdes secondaires sont construits selon la même architecture. Tous, sauf la rate, ont des vaisseaux lymphatiques afférents par où arrIIIent les antigènes. Les lymphocytes B sont retrouvés dans des ***zones dites B-dépendantes*** *que sont les follicules lymphoïdes: ceux qui n'ont pas rencontré l'antigène sont appelés primaires, alors que ceux atteints par un antigène et siège d'une intense prolifération cellulaire au sein d'un centre clair germinatif sont dits secondaires. Les* ***zones T-dépendantes*** *sont principalement les zones paracorticales.*

Pour combattre efficacement une infection il faut que le petit nombre de lymphocytes spécifiques initialement présents soit augmenté. La stimulation par l'antigène provoque une **expansion clonale**: après sa liaison à l'antigène la morphologie du lymphocyte change.

III-7- Le deuxième signal.

La stimulation par le récepteur de l'antigène est nécessaire mais pas suffisante pour activer un lymphocyte. Un **deuxième signal**, délivré par un autre type de cellule, est nécessaire à l'expansion clonale et à la différenciation qui lui fait suite.

Le premier signal par l'antigène contrôle la spécificité de la réponse immunitaire. Le deuxième signal contrôle la pertinence de cette réponse, s'assurant que le système immunitaire répond bien contre un antigène reconnu comme potentiellement dangereux, et non pas contre un constituant du soi ou un antigène inoffensif.

Le deuxième signal est délivré soit directement par les microorganismes, soit par les composants de l'immunité naturelle, soit après traitement de ces mêmes stimuli par des cellules spécialisées.

Pour le lymphocyte B ce deuxième signal est donné par les lymphocytes T, et plus particulièrement la sous-population T CD4TH2. Pour le lymphocyte T naïf, ce deuxième signal, encore appelé co-stimulateur, peut être apporté par trois populations distinctes: lymphocytes B, macrophages et cellules folliculaires dendritiques qui toutes fonctionnent comme des **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)**. Nous reverrons que l'activation du lymphocyte T nécessite non seulement ce co-stimulateur mais aussi un traitement et une présentation particulière de l'antigène dont seules sont capables ces cellules présentatrices.

Les caractéristiques principales des CPA sont les suivantes (voir cours sur les *cellules de l'immunité*):

- capacité de **capter** l'antigène et de le **dégrader partiellement (apprêter)**
- capacité de le **présenter** en **association** avec les **antigènes d'histocompatibilité** (cf III-11)
- expression membranaire de molécules de **co-stimulation**
- sécrétion après stimulation de différentes **cytokines** capables d'agir sur les cellules auxquelles est présenté l'antigène

En l'**absence** de deuxième signal, c'est-à-dire pour une présentation de l'antigène par toute autre cellule de l'organisme, la stimulation du lymphocyte T aboutit à une **non-réponse** qui explique l'absence de réponse aux antigènes du soi exclusIIIement exprimés en périphérie: cette non-réponse, ou **anergie**, est le support de la **tolérance périphérique**. Puisque la majorité des lymphocytes B nécessite une aide des lymphocytes T, **la tolérance T garantit la tolérance B.**

III-8- Le système immunitaire en action.

La réponse immunitaire adaptative vis-à-vis d'un antigène donné peut donc être ainsi dIIIisée en **cinq étapes** :

- la première est l'étape de reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes naïfs porteurs du récepteur complémentaire
- la seconde est la phase d'activation, d'expansion clonale (sélection clonale de BURNET)
- qui aboutit à la phase effectrice où immunité humorale et cellulaire coopèrent pour éliminer l'antigène
- une fois celui-ci éliminé, il y a un retour à l'état de départ (homéostasie) par apoptose des lymphocytes effecteurs spécifiques qui n'ont plus lieu d'exister, le stimulus ayant été éradiqué
- et seuls persistent les lymphocytes mémoire.

On peut ainsi expliquer les propriétés de la réponse immunitaire adaptative :

- la **spécificité** : des microorganismes différents entraînent des réponses différentes
- la **diversité** : le système immunitaire est capable de répondre à une grande variété d'antigènes
- la **mémoire** : elle permet une réponse plus adaptée et plus intense lors de contacts itératifs avec un même antigène
- **l'auto-limitation** : la disparition de l'antigène stimulant régule négativement la réponse immunitaire
- la **tolérance** : qui prévient l'agression vis-à-vis du soi.

Différents mécanismes effecteurs concourent à l'élimination des micro-organismes. Les modes de vie différents de ces derniers nécessitent des mécanismes de reconnaissance et d'élimination adaptés, donc différents.

Ceci s'explique par l'évolution conjointe du monde bactérien et du système immunitaire des organismes évolués : la complexité de la réponse immunitaire résulte en partie de la pression de sélection des microorganismes.

Nous avons vu qu'il existe deux types de récepteurs pour l'antigène: le **BCR** avec l'immunoglobuline de surface du lymphocyte B et le récepteur du lymphocyte T ou **TCR**. Ils fonctionnent différemment : le lymphocyte B reconnaît des micro-organismes à développement extra-cellulaire alors que lymphocyte T peut détecter des micro-organismes qui ont pénétré dans les cellules et dont les antigènes sont réexprimés à la surface des cellules infectées. Les **lymphocytes B** reconnaissent les antigènes dans leur forme intacte, **native** en solution, alors que les **lymphocytes T** ne reconnaissent que des **fragments** présentés à la surface des cellules présentatrices.

Ceci explique que les déficits sélectifs de l'immunité humorale et cellulaire n'aient pas les mêmes conséquences.

III-9- LES ANTICORPS, PRODUITS DU LYMPHOCYTE B.

Le premier produit de la réponse immunitaire à avoir été identifié a été la molécule d'**anticorps**. Les anticorps sont des protéines que l'on retrouve dans le **plasma**, partie liquide du sang, et dans les liquides extra-cellulaires, autrefois appelé humeur, ce qui explique le nom d'**immunité humorale**.

De par sa localisation, l'anticorps est une arme dirigée contre les microorganismes extracellulaires, contre les toxines qu'ils secrètent et contre les antigènes exprimés à la surface des cellules.

Après rétraction du caillot la composante liquide obtenue est appelé **sérum**, contient les anticorps car elle correspond au **plasma défibriné**. Le sérum d'un individu immunisé contre un antigène donné est appelé **antisérum.**

A l'électrophorèse des protéines les anticorps de toutes les spécificités migrent en position gamma et pour certains bêta, et sont donc appelés gammaglobulines ou **immunoglobulines** (voir cours spécifique, *les immunoglobulines*).

*Cette dernière, composée de plusieurs chaînes, a une forme en Y, avec deux bras portant chacun un site de liaison pour le même antigène qui sont très différents d'une molécule d'anticorps à l'autre et une queue à la structure quasi-constante d'une molécule à l'autre. Cette région constante peut se retrouver sous cinq formes, appelées **isotypes** définissant des classes d'immunoglobulines, aux fonctions effectrices différentes. La **dualité structurale** de l'immunoglobuline explique sa **dualité fonctionnelle**.*

*La reconnaissance de l'antigène par les parties variables est le préalable à l'apparition de la plupart des fonctions effectrices supportées par la partie constante et visant à l'élimination de l'antigène. Celle-ci peut se faire selon trois mécanismes: **neutralisation** directe par l'anticorps des micro-organismes pathogènes ou de leurs toxines; **opsonisation** favorisant l'action des phagocytes; et actIIIation du **complément**, ensemble de protéines plasmatiques capables de lyser directement certaines bactéries et de favoriser la phagocytose en agissant comme une opsonine. Le complément et les phagocytes ne sont pas spécifiques de l'antigène: ce sont les anticorps qui ciblent l'antigène comme non-soi agressif aux effecteurs qu'ils recrutent.*

Seuls les lymphocytes B produisent des immunoglobulines. Ils sont appelés ainsi car ils se différencient, chez l'oiseau, dans la **bourse de FABRICIUS**, située près du cloaque vésico-rectal dont l'équvalent comme organe lymphoïde primaire de l'ontogenèse B chez les mammifères est la moelle osseuse, qui se dit bone marrow en anglais (voir ciours sur les *organes de l'immunité*).

L'élément ultime de la différenciation de la lignée B est le **plasmocyte** qui secrète les immunoglobulines à la différence des lymphocytes B de tous les stades précédents qui ne les synthétisent qu'en vue d'une expression membranaire (voir cours sur *les cellules de l'immunité*).

III-10 LES LYMPHOCYTES T.

Les lymphocytes T reconnaissent et attaquent, eux, les cellules infectées par les micro-organismes à développement **intracellulaire**.

Tous les micro-organismes n'ont pas un cycle extra-cellulaire qui les rend vulnérables à l'attaque par les anticorps. Tous les virus, certaines bactéries et certains parasites sont capables de pénétrer dans les cellules et de s'y reproduire à l'abris de l'action des anticorps.

Pour faire face à de tels agresseurs l'organisme dispose d'un deuxième type d'immunité, appelé **immunité cellulaire** supportée par les **lymphocytes T** ainsi nommés car ils se différencient dans le thymus. Ces lymphocytes reconnaissent par contact direct les antigènes des agresseurs exprimés à la surface des cellules infectées. A la différence du lymphocyte B dont la seule fonction effectrice est de produire des anticorps, le lymphocyte T a plusieurs fonctions (voir cours *les lymphocytes T effecteurs*).

Au cours d'une infection virale certains lymphocytes T acquièrent une activité cytolytique qui leur permet de tuer les cellules infectées dans lesquelles les virus, qui ont échappé aux anticorps neutralisants en pénétrant dans la cellule, se reproduisent. L'action de ces **lymphocytes T cytotoxiques** vise à prévenir au plus vite la dissémination de nouvelles particules infestantes dans le voisinage immédiat des cellules infectées.

Cependant certaines bactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis* sont capables de survivre dans les phagosomes des macrophages qui les ont ingérées car elles empêchent la fusion avec les lysosomes qui contiennent de nombreuses substances bactéricides. L'activation

des **lymphocytes T auxiliaires** ou **helper** (ou TH), et plus particulièrement d'une sous-population d'entre eux appelée TH1, par les antigènes mycobactériens exprimés à la surface du macrophage donne à ce dernier le signal pour fusionner lysosomes et phagosomes et ainsi détruire les mycobactéries.

Nous avons vu précédemment qu'il existe une deuxième population de **lymphocytes T auxiliaires** ou **helper** (ou TH), les lymphocytes TH2 chargés de la coopération avec les lymphocytes B.

III-11 La restriction par le CMH.

Contrairement au lymphocyte B qui reconnaît l'antigène dans sa forme native en solution, le lymphocyte T ne reconnaît que des fragments de l'antigène qui lui sont présentés à la surface des cellules par les molécules du **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)** (voir cours spécifique, *le système HLA*)

Ce dernier a ainsi été nommé car sa description fut initialement faite dans l'étude des rejets de greffe de peau. Ceci n'est bien entendu pas sa fonction physiologique.

On lui décrit deux types de molécules: des antigènes ou molécule HLA de **classe I** et des antigènes ou molécules de **classe II** qui diffèrent par des variations structurales, responsables de variations fonctionnelles.

Le lymphocyte T reconnaît spécifiquement le complexe peptide-CMH. Ce phénomène a été mis en évidence initialement chez la souris et appelé **restriction H2**, du nom du CMH de la souris.

Au cours de leur synthèse intra-cellulaire les molécules du CMH sont capables de lier des peptides soit d'origine intrinsèque (du soi), soit d'origine extrinsèque en cas d'infection intracellulaire. Nous avons vu que la réponse des lymphocytes T aux complexes peptides du soi-CMH est en principe prévenue par la tolérance, qu'elle soit centrale ou périphérique.

Cependant le lymphocyte T doit être capable, en cas d'infection par un organisme à développement intracellulaire de distinguer la nature de la cellule infectée pour y apporter la réponse immunitaire adaptée: tuer les cellules infectées ou être stimulés par les **cellules présentatrices d'antigène (CPA)** afin d'initier la réponse immunitaire en aidant les lymphocytes B et les macrophages. Ces CPA, que l'on nomme improprement cellules accessoires, sont les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes B.

Pour ce faire il dispose de **co-récepteurs**, les molécules **CD4** et **CD8**, qui se lient différemment aux molécules du CMH.

Ces co-récepteurs ont pour mission de stabiliser la liaison du lymphocyte T à sa cible et d'orienter la réponse.

Ils sont d'expression **mutuellement exclusive** sur les lymphocytes T sanguins périphériques :

- les lymphocytes **TCD4$^+$**, dits **helper** ou **auxiliaires** ont une fonction régulatrice d'amplification des réponses immunitaires, et sont capables pour ce faire de sécréter de nombreux médiateurs appelés **cytokines**.
- les lymphocytes **T CD8$^+$** sécrètent à un moindre degré des cytokines et ont une fonction effectrice **cytotoxique**.

Les molécules CMH de **classe I**, exprimées sur toutes les **cellules nucléées** de l'organisme lient préférentiellement des peptides de pathogènes qui se répliquent dans le cytosol. Les complexes peptides-CMH de **classe I,** ainsi formés et exprimés à la surface de la

cellule infectée, se lient aux molécules **CD8** exprimées à la surface des lymphocytes T **cytotoxiques**: toute cellule infectée peut donc être éliminée par ces derniers.

Les molécules HLA de **classe II** ne sont exprimées qu'à la surface des **CPA**: elles lient des peptides qui proviennent de la dégradation des protéines dans les vésicules intracellulaires, ce qui est le cas des parasites ou des bactéries qui se répliquent dans les macrophages ou des antigènes internalisés par les lymphocytes B grâce à leurs immunoglobulines de surface. Les complexes peptides-CMH de **classe II,** ainsi formés et exprimés à la surface de la CPA, se lient se lient au co-récepteur **CD4** exprimés sur les lymphocytes T **auxiliaires**. Selon le profil des cytokines sécrétées ces lymphocytes T CD4 sont répartis en deux sous-populations capables d'interagir avec des macrophages ou avec des lymphocytes B, orientant la réponse immunitaire adaptatIIIe soit vers sa composante cellulaire, soit vers sa composante humorale; les premiers sont dits **Th1**, les deuxièmes **Th2** (**h** pour "helper").

De la capacité à se lier à un antigène de classe I ou de classe II du CMH, pour un peptide issu d'un pathogène, dépendra, chez un individu donné, la plus ou moins bonne aptitude de ce dernier à déclencher une réponse immunitaire (en cas de liaison à un antigène de classe I), et à éliminer les cellules infectées (en cas de liaison à un antigène de classe II).

L'acquisition de cette double dualité fonctionnelle (T CD4 / T CD8 d'une part, Th1 / Th2 d'autre part) par les lymphocytes T reste l'un des mystères de l'immunologie. Pourquoi, par exemple, une liaison CD8-peptide/CMH classe I entraîne-t-elle une réponse cytolytique, et à quel stade de maturation le lymphocyte T acquiert-il cette potentialité?

*L'immunité à médiation cellulaire est caractérisée par une très grande diversité au sein des individus d'une même espèce, liée au **polymorphisme** du CMH. Au contraire des récepteurs spécifiques de l'antigène (Ig, TCR), les molécules du CMH sont codées par un très petit nombre de gènes, situés sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme (locus **HLA** pour "human leukocyte antigen"), dont il existe un très grand nombre d'allèles et qui ne subissent aucun réarrangement. Ceci explique la probabilité quasi nulle qu'ont deux individus non apparentés pris au hasard d'être strictement HLA-identiques. La réponse immunitaire spécifique utilise donc deux types de dIIIersité : la **diversité combinatoire** des récepteurs spécifiques et celle, **allélique**, du CMH. La dIIIersité du CMH est largement répartie entre les individus de l'espèce alors que chaque individu possède la totalité du répertoire potentiel T et B. Ainsi la conjonction des deux diversités, combinatoire des récepteurs d'antigène et polymorphique du CMH, permet la survie de l'espèce. En effet le polymorphisme important du CMH permet de distinguer au sein d'une espèce les individus capables d'une forte réponse immunitaire vis-à-vis d'un pathogène donné, de ceux qui en sont incapables. L'absence totale de polymorphisme conduirait, pour certains antigènes, à une impossibilité complète de réponse pour la totalité des individus, et donc au risque potentiel de disparition de l'espèce en cas d'exposition à ce pathogène. L'introduction du polymorphisme allélique du CMH permet donc la survie de l'espèce, le prix à payer étant la disparition des mauvais répondeurs.*

III-12 Immunité naturelle et immunité acquise.

Le déroulement de la réponse immunitaire se fait en deux temps par la mobilisation successive des deux types d'immunité, **naturelle** puis **acquise**. Ceci est important pour deux raisons. L'immunité naturelle fournit une réponse immédiatement recrutable en attendant que l'immunité acquise devienne opérationnelle. Celle-ci apparue secondairement s'est appropriée tout ou partie de ces mécanismes pour amplifier sa réponse.

Chez les organismes supérieurs, comme l'homme, les principales agressions sont de nature traumatiques ou infectieuses. Se sont d'abord développés chez ces organismes des mécanismes de défense immédiate constitués de système d'activation en cascade tels que le complément, le système contact, le système des kinines, la coagulation et la fibrinolyse. Leur activation conduit à la formation d'agrégats moléculaires à actIIIité enzymatique responsable de la protéolyse de certains de leurs constituants qui, une fois actIIIés, vont être responsables après liaison à des récepteurs cellulaires spécifiques, des phénomènes biologiques conduisant au rejet de l'agresseur.

Les mécanismes de stimulation de la réponse immunitaire naturelle sont le plus souvent des composants structuraux partagés par des microorganismes apparentés, et absents chez l'hôte dans lequel ces

agents pathogènes sont introduits. Si l''immunité naturelle n'a pas de spécificité clonale, elle est cependant capable de distinguer ce qui représente un danger pour l'organisme.

L'immunité naturelle repose sur des mécanismes **humoraux** (complément, cytokines, protéines de la phase aiguë de l'inflammation, ...) et **cellulaires** (cellules à fonction phagocytaire ou lytique, telles que les polynucléaires, les cellules tueuses naturelles, ou NK pour "Natural Killer cells", macrophages, ..). (voir cours spécifiques *immunité naturelle*, *complément* et in *cellules de l'immunité*)

Les cellules impliquées dans l'immunité naturelle ont un rôle crucial dans l'initiation et l'amplification ultérieure de la réponse immunitaire adaptative. De plus, eu égard au délai de quatre à cinq jours pour la mise en action de cette dernière, l'immunité naturelle est essentielle pour circonscrire les infections durant cette période.

La réponse de l'organisme à une agression par un micro-organisme pathogène peut être divisée en trois phases dont la suite logique est indispensable à l'élimination de l'agresseur. Le premier stade immédiatement mis en jeu repose sur la mobilisation des éléments préexistants de l'immunité innée (facteurs physiques, humoraux et cellulaires). Dans les heures qui suivent des facteurs inductibles de l'immunité naturelle sont recrutés, telles que les protéines de la phase aiguë de l'inflammation: ces facteurs ne sont ni spécifiques de l'antigène, ni doués de propriétés anamnestiques. Si l'infection s'arrête à ce stade il n'y a pas de mémoire immunologique. Au bout de trois à quatre jours la troisième phase, tardive, est l'entrée en lice de la réponse immunitaire acquise, basée sur la sélection clonale des lymphocytes spécifiques. L'immunité naturelle a un rôle fondamental en circonscrivant l'infection et en fournissant de nombreuses molécules aux fonctions co-stimulatrices pour l'induction de la réponse immunitaire acquise.

Cette succession se fait au cours d'une réponse inflammatoire. L'**inflammation** est définie par quatre piliers: *dolor, rubor, calor* et *tumor*, soit douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction. Elle est la conséquence de l'action des cytokines synthétisées par les cellules de la réponse immunitaire naturelle.

Elle est la conséquence de la vaso-dilation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et des modifications des propriétés d'adhérence des différentes cellules vis-à-vis de l'endothélium vasculaire induites par les premières cellules phagocytaires qui ont ingéré le micro-organisme. Ceci permet l'afflux des effecteurs (humoraux et cellulaires: complément, protéines de la phase aiguë de l'inflammation, polynucléaires et macrophages) de l'immunité naturelle puis ceux (anticorps et lymphocytes) de l'immunité acquise.

Le caractère pathogène des microorganismes est en partie lié à leur capacité d'échappement à la réponse immunitaire naturelle par différents mécanismes : capsule des bactéries qui masque les antigènes de parois, absence des structures invariantes et partagées à la surface des virus ou modifications évolutIIIes très rapide des structures de surface des parasites (paludisme) ou des virus (VIH ou virus de l'immunodéficience humaine).

De nombreux micro-organismes se sont adaptés au cours de l'évolution pour résister aux effecteurs de l'immunité naturelle. La réponse immunitaire acquise est alors indispensable. Les effecteurs spécifiques (anticorps, TCR) signalent alors aux effecteurs non-spécifiques, qu'ils recrutent, les cibles à éliminer.

III-13 La mémoire immunologique.

La propriété la plus fondamentale de l'immunité acquise est la **mémoire** immunologique, autrement dit la capacité de répondre plus rapidement et plus intensément à une deuxième rencontre avec l'antigène. On parle de **réponse primaire** pour toute première rencontre avec un antigène donné, et de **réponse secondaire** lors de la réintroduction du même antigène.

Pour l'immunité humorale ces deux types de réponse diffèrent par le **délai** d'apparition, la **rapidité** et l'**intensité** de la réponse, l'**affinité** et la **classe** des anticorps. La réponse anticorps secondaire apparaît après une phase de latence plus courte, atteint un

plateau de nIIIeau plus élevé avec des anticorps d'affinité plus forte et de nature IgG principalement, alors qu'ils sont de classe IgM pour la réponse primaire.

La mémoire immunologique s'explique par la plus grande fréquence des précurseurs T et B. Les cellules mémoire sont en outre qualitatIIIement différentes des lymphocytes naïfs qui opèrent en réponse primaire : pour les lymphocytes B les anticorps de réponse secondaire ont une affinité plus élevée pour l'antigène, et pour les lymphocytes T ils migrent préférentiellement dans les sites de l'infection.

C'est la mémoire immunologique qui est la base théorique des succès de la ***vaccination,*** *qui vise à générer des cellules mémoire par un premier contact avec un agent infectieux dont la virulence a été abolie mais l'antigénicité conservée, et des rappels vaccinaux qui ont pour objectif de restimuler ces cellules mémoire.*

III-14 La mise en jeu de la reponse immunitaire.

La mise en place de la réponse adaptatIIIe bénéficie de la mise en route initiale de la réponse innée, qui va notamment permettre de répondre à la question que ne peuvent résoudre les immunorécepteurs, simples molécules de reconnaissance et de couplage. Comment l'organisme peut-il distinguer les antigènes contre lesquels il doit **réagir** (ceux des pathogènes) de ceux qu'il doit **ignorer** (antigènes exogènes inoffensifs) ou **tolérer** (antigène du soi), distinction que ne peuvent assumer les TCR et BCR ?

Trois théories, non mutuellement exclusives, essayent de répondre à cette question.

III - 14 - 1 - la théorie du danger

La première, développée par Polly Matzinger, est le modèle **du danger**. Pour cette chercheuse, ce n'est plus le paradigme de la distinction soi/non-soi (caractère étranger) qui déclenche la réponse immunitaire, mais le caractère reconnu comme potentiellement dangereux d'un constituant.

Est considéré comme dangereux tout antigène qui sera capable de générer un signal de co-stimulation sur les cellules dendritiques (signal 2), indispensable à l'activation du lymphocyte T naïf. Ces ***signaux de danger*** *sont reconnus par des récepteurs spécifiques exprimés à la surface de la cellule dendritique. Ces signaux peuvent être d'origine endogène ou exogène : endogène quand les cellules de l'organisme meurent par nécrose, et libèrent des constituants intra-cellulaires qui ne le sont pas quand elles meurent par apoptose et qu'elles sont phagocytées ; exogène, exprimés à la surface des pathogènes. Certains de ces signaux sont "prêts à l'emploi", d'autres sont inductibles, libérés par des cellules soumises à des agressions (irradiation, chaleur, infection). Sur les pathogènes, les récepteurs de danger reconnaissent des motifs moléculaires partagés par un grand nombre de micro-organismes, mais pas retrouvé chez les vertébrés : on les nomme PAMPs ou MMAP (Pathogen Associated Molecular Patterns ou Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes). Plusieurs familles de récepteurs permettent cette distinction grossière du non-soi : lectines de type C, protéines riches en leucine, pentraxine, lipides transférase, et récepteurs Toll-like.*

III - 14 - 2 - la théorie infectieuse

Dans la seconde théorie, soutenue par Charles Janeway Jr, le paradigme du fonctionnement de la réponse immunitaire est la **reconnaissance des micro-organismes pathogènes.**

Ce sont eux, et seulement eux, qui, par l'intermédiaire de la reconnaissance de leurs MMAP par les cellules dendritiques, vont être capables de délivrer le signal 2 indispensable au déclenchement de la réponse immunitaire. Il place l'évolution de la réponse immunitaire sous la pression sélective des agents infectieux et donne à la réponse innée le rôle de starter de la réponse adaptative.

III - 14 - 3 - la théorie du rôle central de l'antigène

Enfin, Rolf ZINKERNAGEL, prix Nobel suisse, plaide pour le rôle central de **l'antigène**, quelle que soit son origine.

*Dans son modèle, ce sont la **distribution**, la **dose** et le **temps** de présence de l'antigène qui sont les paramètres principaux pour déclencher la réponse immunitaire. Celle-ci ne peut survenir que dans les organes lymphoïdes secondaires dont seul le micro-environnement structuré permet le temps de contact nécessaire entre l'antigène et tous les acteurs cellulaires de la réponse immunitaire. Pour lui le signal 2 n'est pas indispensable et tous les antigènes uniquement localisés dans les tissus non lymphoïdes sont ignorés du système immunitaire.*

III-15 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE EN PATHOLOGIE.

Le rôle du système immunitaire est de nous protéger conte les agents infectieux: ceci est bien mis en évidence par les infections récidivantes observées chez les personnes qui souffrent de déficit immunitaire. Cependant une réponse immunitaire normale contre un antigène innaproprié peut avoir des conséquences pathologiques: **allergie** dirigée contre des antigènes ubiquitaires bénins, **maladies auto-immunes** dirigées contre des antigènes du soi. A l'inverse la défaillance du système immunitaire pourrait participer à la survenue des **cancers**. Le bon fonctionnement du système immunitaire en tant que gardien du soi est le principal obstacle à l'utilisation des greffes d'organes.

Une pathologie peut aussi résulter d'une réponse immunitaire normale qui dépasse son but ou qui dure trop longtemps, bien après l'élimination de l'agent causal. Cette notion est à la base de la **classification des états d'hypersensibilité** proposée par GELL et COOMBS en 1963. Ces réactions ont été classées en fonction de la vitesse de réaction et du mécanisme effecteur.

L'**hypersensibilité de type I** (**immédiate** ou **anaphylaxie**):

Elle survient dans les minutes qui suivent le contact avec l'antigène (appelé **allergène**). Elle dépend de l'actIIIation des **mastocytes** provoquant la libération de médiateurs de l'inflammation aiguë. L'allergène se fixe aux mastocytes, préalablement sensibilisés par des **IgE** liées récepteur pour le Fc des IgE.

Elle est en cause dans l'asthme, le rhume des foins et certains types d'eczéma.

L'**hypersensibilité de type II** (**cytotoxicité dépendante des anticorps**):

Elle est causée par la liaison d'anticorps avec des antigènes de la surface cellulaire ou de la matrice extra-cellulaire. Ces anticorps sont alors capables d'entraîner la destruction de leur cible par activation du **complément** ou de cellules **NK** (ADCC ou "Antibody dependent cell cytotocicity"). Le délai d'apparition est **rapide**.

Les hémolyses post-transfusionnelles et la maladie hémolytique du nouveau-né relèvent de ce type d'hypersensibilité, ainsi que le rejet hyperaigu d'une greffe d'organe chez un receveur pré-immunisé (cf cours de DCEM 2).

L'**hypersensibilité de type III** (**dépendante des complexes immuns**):

Elle est d'apparition **semi-retardée**. Elle est causée par le dépôt tissulaire ou vasculaire de **complexes immuns** antigène-anticorps, qui se voient en cas de forte charge

antigénique associée à une réponse immunitaire faible ou inefficace. Ces complexes sont alors capables d'activer le complément et de recruter les polynucléaires et les macrophages, expliquant les dégâts tissulaires observés.

Certaines maladies auto-immunes, telles que le lupus aigu érythémateux disséminé, sont associées à la présence de complexes immuns.

L'**hypersensibilité de type IV** (**retardée**);

Elle survient plus de **24 heures après** la rencontre avec l'antigène. Ce délai s'explique par son mode d'action: elle repose sur l'activation des **lymphocytes T CD4** sensibilisés à l'antigène qui libèrent des cytokines néoformées, capables de recruter et d'actIIIer les macrophages. Ceux-ci provoquent des lésions tissulaires connues sous le nom de **granulome.**

Certaines dermatites de contact et certaines infections à mycobactéries (M tuberculosis, M leprae) relèvent de ce type d'hypersensibilité.

RESUME

Le système immunitaire des vertébrés évolués protège l'hôte contre les infections: la réponse immunitaire naturelle constitue la première ligne de défense qui associe des mécanismes physiques, humoraux et cellulaires qui se conjuguent pour donner la réponse inflammatoire. C'est une réponse non discriminante sans caractère anamnestique qui ne permet donc pas de prévenir les récidives. L'existence à la surface des lymphocytes de récepteur clonotypique confère ces deux propriétés (spécificité et mémoire) à la réponse immunitaire acquise, dont ces cellules sont les effecteurs. Cette réponse utilise, dans sa branche effectrice, bon nombre de composants de la réponse immunitaire naturelle. L'élimination des agresseurs étrangers nécessite le plus souvent la coopération des deux types d'immunité spécifique, humorale et cellulaire, respectivement supportée par les lymphocytes B et les lymphocytes T, éduqués dans la moelle osseuse et le thymus, qui sont les organes lymphoïdes primaires. La sélection clonale explique la production de cellules mémoire permettant la génération d'une réponse secondaire plus rapide et plus efficace en cas de réinfection, ainsi que la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi

POUR EN SAVOIR PLUS:

AMEISEN JC *La sculpture du vivant. Le suicide cellulaire ou la mort créatrice.* Le Seuil, Paris, 1999

BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique.* Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 1-3

DAERÖN M *Le système immunitaire, ou l'immunité cent ans après Pasteur* INSERM/ Nathan Paris 1995

GENETET B Introduction in GENETET N *Immunologie* Eminter 2002 :1-6

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 1-2

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997

KANELLOPOULOS J, OJCIUS DM La notion de danger médecine/sciences 2000, **16** : 865-73

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999

MOULIN AM *Le dernier langage de la médecine. Histoire de l'Immunologie de Pasteur au SIDA.* PUF Paris 1991

MOULIN AM (ed) *L'aventure de la vaccination.* Fayard Paris 1996

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2001 : 17-33

SCHALCHLI L Le système immunitaire *La Recherche*, 1997, n° **308**: 90-3.

TESTER-VOUS

1 - L'immunité naturelle est :

A: spécifique de l'antigène
B: mise en jeu immédiatement
C: fait intervenir des cellules phagocytaires
D: repose sur l'action des lymphocytes
E: est exclusIIIement humorale

2 - Un lymphocyte mature exprime à sa surface des molécules capables de reconnaître l'antigène

A: appelées immunoglobulines de surface pour le lymphocyte T
B: appelées TCR pour le lymphocyte B
C: de spécificité antigénique unique pour un lymphocyte donné
D: obtenues après mécanique recombinatoire génétique
E: uniquement si ce dernier est présenté par un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité, quel que soit le lymphocyte

3 - Le lymphocyte T

A: reconnaît l'antigène sous sa forme native
B: nécessite une cellule présentatrice d'antigène pour être activé par ce dernier
C: reconnaît l'antigène présenté par des antigènes HLA de classe II quand il est cytolytique
D: porte la molécule co-réceptrice CD4 quand il a une fonction "helper" (auxiliaire)
E: est éduqué dans la moelle osseuse

4 - Les cellules synthétisant des immunoglobulines de surface sont

A: les lymphocytes T
B: les plasmocytes
C: les polynucléaires basophiles
D: les cellules tueuses naturelles (NK pour "natural killer cells")
E: les lymphocytes B

5 - La théorie de la sélection clonale

A: suppose la présence de l'antigène dans les organes lymphoïdes primaires
B: explique la tolérance au soi par élimination physique ou fonctionnelle des clones auto-réactifs
C: s'applique à l'immunité naturelle
D: explique la capacité de mémoire de l'immunité acquise
E: repose sur l'existence de molécules de reconnaissance spécifiques de l'antigène à la surface des lymphocytes

6 - Au cours de l'immunité à médiation cellulaire dite hypersensibilité retardée, les éléments essentiellement en cause sont :

A - les lymphokines
B - les anaphylatoxines
C - les monocytes/macrophages
D - les lymphocytes T
E - les basophiles

7 - La réponse immunitaire humorale de type secondaire :

A: est plus précoce que la réponse primaire
B: est plus durable que la réponse primaire
C: est en rapport avec la mémoire immunitaire
D: ne se produit que pour des antigènes thymo-indépendants
E: est mise en jeu lors des rappels de vaccination

8 - Quels sont les qualificatifs qui s'appliquent à la mémoire immunologique :

A: supportée par les lymphocytes B
B: supportée par les macrophages
C: de longue durée
D: non spécifique
E: supportée par les lymphocytes T

9 - L'immunité active est impliquée dans :

A - les rappels de vaccination
B - la sérothérapie anti-tétanique
C - le transfert placentaire des anticorps maternels
D - l'immunité conférée par une greffe de moelle osseuse réussie
E - l'immunité conférée par la rougeole

10 - Les principales cellules présentatrices d'antigène sont :

A - les polynucléaires basophiles
B - les monocytes/macrophages
C - les lymphocytes B
D - les lymphocytes T
E - les cellules dendritiques

LES ANTIGENES

I - INTRODUCTION

II - DEFINITIONS

II - 1 Définition classique

II - 2 Définition actuelle

II - 3 Notion de déterminants antigéniques ou épitopes

II - 4 Notion d'immunogène

II - 5 Notion d'haptène

II - 6 Notion de spécificité antigénique

II - 7 Differents types d'antigenes

II - 8 Notion d'immunité

II - 9 Notion d'hypersensibilité

III- PARAMETRES DU POUVOIR IMMUNOGENE

III-1 Paramètres liés à l'antigène

III-1-1 Distance taxonomique

III-1-2 Paramètres physico-chimiques

III - 1-2-1 taille moléculaire
III - 1-2-2 rigidité
III - 1-2-3 complexité

III-1-3 Paramètres biochimiques

III -1-3-1 les protéines
III -1-3-2 les glucides
III -1-3-3 les lipides
III -1-3-4 les acides nucléiques

III-1-4 Le catabolisme

III-1-5 Valence antigénique.

III-2 Paramètres liés à l'hôte

III-2-1 gènes Ir

III-2-2 âge

III-3 Paramètres liés aux conditions d'immunisation

III-3-1 dose d'immunogène

III-3-2 voies d'administration

III-3-3 adjuvants

III-3-4 nature de l'immunisation.

III-4 Notion d'antigènes thymo-dépendants et thymo-indépendants.

IV - ANTIGENICITE

IV - 1 Antigène polyosidique

IV - 2 Antigènes protéiques reconnus par les anticorps

IV - 3 Epitopes T des protéines et des polypeptides.

IV - 4 Superantigène

V - CONCLUSION

LES ANTIGÈNES : OBJECTIFS

Niveau A :
- **antigène**
- **immunogène**
- **épitope**
- **spécificité antigénique**
- **épitope conformationnel/séquentiel**

Niveau B :
- **tolérogène**
- **haptène**
- **réaction croisée**
- **antigènes naturels, synthétiques, artificiels**
- **xéno-, allo-, auto-antigène**
- **immunité active/passive, naturelle/acquise**
- **valence antigénique**
- **épitope conformationnel/séquentiel**
- **antigènes thymo-dépendants/indépendants**
- **paramètres du pouvoir immunogène**

LES ANTIGENES

I - INTRODUCTION

Les antigènes sont des structures moléculaires reconnues spécifiquement par le système immunitaire.

La notion d'**antigène**, reconnu spécifiquement par un organisme est purement opérationnelle et dépend de l'espèce dans laquelle est introduite la molécule antigénique. L'induction délibérée d'une réponse immunitaire par injection d'une substance étrangère s'appelle **immunisation.**

L'étude des antigènes a été initialement faite expérimentalement avec des substances non-vivantes. Nous verrons que la dose, la voie d'administration et la forme de l'antigène peuvent influencer l'induction et le type de réponse immunitaire.

L'évolution de celle-ci est suivie sur l'apparition d'une ou plusieurs réactions: pour la réponse immunitaire humorale le contrôle porte sur la réponse anticorps analysée à partir de l'antisérum obtenu. Pour la réponse cellulaire, ce sont les réponses des lymphocytes T qui sont étudiées.

Le problème structural de l'antigénicité a deux volets : l'antigène d'une part, l'hôte (et son génome) dans lequel il est introduit d'autre part. On ne peut parler de l'antigénicité d'une molécule donnée qu'en référence à un organisme receveur. **Il n'y a pas d'antigénicité en soi.**

La parfaite connaissance des bases chimiques et génétiques de l'antigénicité est le préalable indispensable à la mise au point de **vaccins** efficaces, c'est-à-dire capables d'induire une réponse immunitaire protectrice durable sans effets indésirables

II - DEFINITIONS

II -1- DÉFINITION CLASSIQUE:

On appelle **antigène** toute substance étrangère à l'organisme qui, introduite par voie parentérale, est susceptible d'induire la formation d'anticorps avec lesquels elle s'unira spécifiquement.

Cette définition mérite d'être corrigée pour plusieurs raisons :

*a- L'antigène n'est pas toujours étranger à l'organisme : c'est notamment le cas des **auto-antigènes** induisant des auto-anticorps parfois responsables de maladies auto-immunes.*

*b- La voie parentérale utilisée en expérimentation animale ou en vaccination humaine n'est pas la route naturelle de pénétration des antigènes naturels dans l'organisme : le contact se fait habituellement par inhalation ou ingestion, donc au niveau des muqueuses. Les **muqueuses** (pulmonaires, digestives) représentent une très grande surface de contact avec l'extérieur (**400 m^2**) et sont caractérisées par la prédominance d'un isotype d'Ig, l'**IgA**, et des sous-populations lymphocytaires B et T adaptées à cette **réponse IgA**.*

c- L'antigène ne sollicite pas le plus souvent qu'une réponse de type humoral, à anticorps, mais simultanément une réponse de type cellulaire médiée par les lymphocytes T sécrétant des médiateurs locaux non anticorps de type lymphokines ou cytokines.

*d- Les réactions antigène-anticorps sont généralement spécifiques (cf. infra) : il existe cependant des **réactions croisées** au cours desquelles des molécules apparentées à l'antigène d'origine peuvent réagir avec le même anticorps.*

Les **réactions croisées** peuvent être le résultat de trois phénomènes qui sont :

- le partage d'antigènes communs par deux préparations antigéniques distinctes
- le partage d'épitopes communs par deux molécules d'antigènes distinctes

- la quasi ressemblance de deux épitopes

II - 2 - Définiton actuelle :

On appelle **antigène** toute espèce moléculaire naturelle ou synthétique capable d'induire une réponse immunitaire dans un organisme vivant et de réagir spécifiquement avec les produits de cette réponse, BCR/anticorps et récepteur T.

Dans certains cas, en fonction de la dose, du type d'antigène considéré et de la voie d'introduction l'organisme développe un état dit de **tolérance**, correspondant à une absence apparente de réponse immunitaire. Il s'agit néanmoins d'un phénomène actif, spécifique, induit par une première exposition à l'antigène. Les substances qui induisent un tel état sont dites **tolérogènes** par comparaison au mot antigène. On distingue une tolérance naturelle vis-à-vis du soi (règle de Ehrlich "horror auto-toxicus") et une tolérance induite, contre une substance normalement antigénique, grâce à des artifices expérimentaux.

II - 3 - Notion de déterminants antigéniques ou épitopes :

La plupart des antigènes sont des macromolécules, protéiques ou glucidiques, présentant à leur surface des reliefs, des aspérités dus au repliement des chaînes polypeptidiques ou glucidiques sur elle-même : ce sont ces structures limitées, appelées **épitopes** ou **déterminants antigéniques**, qui sont capables de se lier de manière stéréospécifique avec le site complémentaire de la molécule de reconnaissance (**paratope**).

Un épitope correspond à une zone de 1 à 3 nm de diamètre, soit **15 à 18 acides aminés** pour une protéine, soit **5 à 6 oses** pour un polysaccharides.

Les antigènes possèdent habituellement à leur surface un grand nombre de déterminants, qui peuvent être différents les uns des autres, chacun étant capable d'induire la production d'un anticorps spécifique, ou au contraire être des structures répétitives. En réponse à l'introduction de cet antigène dans un organisme on aura donc la production d'une famille d'anticorps, chacun d'eux répondant aux différents épitopes : l'antisérum obtenu est dit **polyclonal**.

On sait maintenant fabriquer, grâce à la technologie des hybridomes, des **anticorps monoclonaux**, dirigés contre un seul et même épitope : ils sont de plus en plus utilisés au laboratoire, eu égard à leur spécificité rigoureuse, et commencent à être utilisés en thérapeutique, notamment anti-cancéreuse.

*Les **hybridomes**, producteurs d'anticorps monoclonaux, sont obtenus par fusion de cellules spléniques de souris, immunisées par un antigène donné, avec des cellules myélomateuses murines.*

La fusion se fait en utilisant du polyéthylèneglycol. Les cellules spléniques sont incapables de survivre longtemps en culture, à la différence des cellules myélomateuses dont la capacité à croître indéfiniment en culture est un des caractères du phénotype malin.

Les cellules spléniques apportent à l'hybride de fusion l'information codant pour produire les anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt. Les cellules myélomateuses sont soigneusement sélectionnées d'une part pour leur caractère non sécrétant, de façon à ce que les seuls anticorps produits par les cellules de fusion soit d'origine splénique, d'autre part pour leur sensibilité au milieu HAT qui permet de sélectionner les seuls hybrides. Les cellules myélomateuses sont déficitaires en enzyme hypoxanthine-guanosine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Ce déficit enzymatique empêche la transformation de l'hypoxanthine en inosine monophosphate, lequel ne peut être obtenu que par synthèse endogène qu'il est alors facile de bloquer en ajoutant de l'aminoptérine sous forme de milieu HAT (hypoxanthine-aminoptérine-thymidine). Ainsi au bout de quelques heures seuls survivront les hybrides immortalisés qui ont hérités du gène HGPRT fonctionnel des cellules spléniques.

Il faut après procéder au clonage qui vise à sélectionner les hybrides qui produisent des anticorps contre les épitopes de l'antigène immunisant. Ce clonage se fait à partir d'une cellule unique grâce à la méthode de dilution limite.

Par la suite cet hybridome peut être cultivé, soit en flasque in vitro, soit in vivo sous forme d'ascite après injection intra-péritonéale chez des souris histocompatibles: ceci permet d'obtenir de grandes quantités d'anticorps après purification à partir des surnageants ou des ascites.

Bien que plus spécifiques que les antisérums polyclonaux, les antisérums monoclonaux, dirigés contre un épitope unique, donnent justement plus facilement lieu à des réactions croisées : en effet leur cible peut être plus facilement partagée par deux molécules différentes, que l'ensembles des déterminants reconnus par la population hétérogène d'anticorps d'un antisérum polyclonal.

L'ensemble des épitopes reconnus définit ce que l'on appelle le **répertoire** immunologique qui est évalué à 10^8 pour les lymphocytes B et 10^5 pour les lymphocytes T

II - 4 - Notion d'immunogènes :

Ce terme désigne les substances antigéniques capables d'induire *in vivo* une réponse immunitaire et de réagir spécifiquement, *in vivo* et *in vitro* avec les molécules de reconnaissance ainsi induites. Par contre au sens strict du terme, l'antigène désigne cette même substance mais étudiée *in vitro*, du point de vue du laboratoire.

Donc, bien que tous les immunogènes soient des antigènes, **tous les antigènes ne sont pas des immunogènes.**

En d'autres termes l'**antigénicité** est la propriété d'un **épitope** de se **lier** au **paratope** de l'anticorps ou du TCR.

II - 5 - Notion d'haptène :

Du grec *"hapteïn"* (attacher) la notion d'haptène a été introduite en 1921 par Landsteiner pour qualifier des substances **non antigéniques par elles-mêmes**, mais pouvant le devenir lorsqu'elles sont couplées à des **macromolécules porteuses ("carrier")**.

Ce sont donc des substances qui ne possèdent qu'une seule des deux propriétés énoncées ci-dessus, la capacité de se combiner spécifiquement avec une molécule de reconnaissance ; prises isolément elles sont incapables d'induire une réponse immunitaire. Cependant, une fois celle-ci mise en place, par un artifice de couplage, elles peuvent, isolément, se combiner aux molécules de reconnaissance.

Les macromolécules naturelles peuvent être assimilées, dans une certaine mesure, à un complexe haptène-porteur où la grosse masse de la molécule, dans la profondeur, est de type porteur hérissée d'aspérités de formes diverses (les épitopes) et de petites dimensions répondant à une sorte d'haptènes naturels.

Au début du siècle l'étude des antigènes ne pouvait être faite avec les antigènes naturels, beaucoup trop complexes pour la biochimie de l'époque.

*En 1921 Landsteiner individualisait la notion d'**haptène** en constatant qu'un extrait alcoolique de rein de cheval n'était pas immunogène chez le lapin alors que l'immunisation par un broyat de tissu rénal de cheval aboutissait à la formation d'anticorps chez le lapin dont certains reconnaissaient l'extrait alcoolique. La substance présente dans l'extrait alcoolique, qu'il appelait haptène, nécessitait donc le couplage à une autre molécule au sein du broyat pour induire la formation d'anticorps mais, une fois ceux-ci formés, était capable de se lier à eux.*

Les progrès de la chimie ont permis, dès les années trente, de synthétiser des antigènes artificiels consistant en un noyau protéique, xénogénique ou autologue, bon immunogène, comme par exemple l'albumine bovine ou les gammaglobulines, sur lesquelles sont greffés différents radicaux chimiques simples. Le rapport haptène-porteur est critique : on a ainsi calculé que pour l'albumine il est de dix haptènes par molécule.

Le couplage de l'haptène au porteur peut se faire par simple contact (pour les dérivés nitrophénolés) ou nécessite la présence d'un agent de liaison, qui permet la fixation de l'haptène aux groupements réactifs du porteur (-NH_2, -COOH et -SH). Différents agents sont utilisés (glutaraldéhyde, sels de diazonium, benzoquinones, carbodiimides, isocyanate, N-hydroxysuccimide, etc...).

L'haptène libre, après couplage, est éliminé par dialyse ou chromatographie. L'immunisation en présence d'adjuvant de Freund permet d'obtenir des antisérums contenant des anticorps anti-haptène, anti-porteur et anti-"lien". Les deux derniers sont éliminés par passage de l'antisérum sur des immuno-adsorbants constitués de l'haptène couplé à des porteurs différents.

La réaction haptène-anticorps est le modèle le plus pur de la réaction antigène-anticorps. Elle peut être étudiée par des méthodes physiques (dialyse à l'équilibre, extinction de fluorescence, ultra-centrifugation), immunochimiques (précipitation, inhibition de la précipitation), sérologique (inhibition de l'hémagglutination passive). A l'exclusion de la précipitation qui nécessite le couplage de l'haptène au porteur toutes les autres méthodes utilisent l'haptène isolé.

*On observe une réponse anti-haptène secondaire optimale si ce dernier est couplé au même porteur lors de l'immunisation primaire et secondaire. Ceci traduit l'**effet-porteur.** Ceci peut être observé avec un haptène, le dinitrophénol (DNP) couplé à différents porteurs (albumine bovine [BSA], ovalbumine [OVA]). On observe que la réponse anti-DNP est maximum lorsqu'on utilise le même conjugué haptène-porteur pour l'immunisation primaire et secondaire. L'effet-porteur peut être contourné en immunisant l'animal contre le second porteur avant le rappel. C'est l'amorçage par le porteur ("carrier priming").*

L'utilisation des haptènes a permis très rapidement de mettre en évidence le très grand pouvoir discriminant de reconnaissance du système immunitaire. En effet, celui-ci est capable de reconnaître des noyaux benzoïques différemment substitués comme l'illustre la figure ci-dessous : sur le noyau benzoïque on fixe en ortho, méta ou para divers radicaux : on produit l'antisérum originel contre la formule comprenant en position méta le radical SO_3 et on compare l'intensité de la réaction antigène-anticorps produite par l'antisérum d'origine contre les formules chimiques très légèrement différentes, obtenant le résultat figurant dans le tableau ci-dessous :

	Ortho	Méta	Para	
R = ASO_3H	-	+	-	
R = SO_3	++	+++		+/-
R = CO_2	-	-	-	

Comme on pouvait s'y attendre c'est avec la formule qui a servi à l'immunisation qu'on obtient la réaction la plus forte ; mais il existe aussi des réactions croisées avec d'autres radicaux ; c'est toutefois la position méta qui donne les meilleurs résultats ce qui conduit à la conclusion que, plus que la formule chimique proprement dite, c'est la structure tridimensionnelle, liée à la configuration dans l'espace des atomes et des nuages d'électrons qui les entourent, qui est importante.

*L'ensemble de ces travaux sur les haptènes a permis de montrer que la présence de résidus chargés, l'orientation dans l'espace étaient des facteurs qui influençaient la spécificité hapténique : l'utilisation d'énantiomères différents aboutit à la formation d'anticorps différents. Ce qui est donc reconnu par le système immunitaire c'est le **groupement hapténique**, ensemble constitué par l'haptène et son micro-environnement sur le porteur. Il existe même des **anticorps hétéroclitiques** qui ont une plus grande affinité pour un haptène voisin mais distinct de celui utilisé pour l'immunisation (mis en évidence dans un système acide para-aminobenzoïque (PAB) couplé aux gammaglobulines de boeuf [GGB] : l'inhibition de la précipitation PAB-GGB antisérum est plus forte avec certains analogues du PAB qu'avec le PAB lui-même).*

Seule une partie de l'haptène participe à la constitution du déterminant antigénique et se situe le plus souvent à l'opposé de la liaison au porteur. Ceci est bien mis en évidence par la digoxine dont le déterminant antigénique, noyau stéroïde, est lié par un sucre au porteur. Les anticorps anti-digoxine présentent une forte réaction croisée avec le deslanoïde qui possède le même noyau stéroïde mais un sucre différent et sont peu ou pas réactifs avec la digitoxine qui possède le même sucre mais un noyau stéroïde différent.

Les anticorps anti-haptène ont une importance en pathologie car ils peuvent être responsables de réactions immunoallergiques à certains médicaments, notamment la pénicilline.

II - 6 - NOTION DE SPÉCIFICITÉ ANTIGÉNIQUE :

C'est la capacité de se lier avec des molécules de reconnaissance. Le **pouvoir immunogénique** d'une molécule (la capacité d'induire une réponse immunitaire) ne préjuge en rien de la spécificité antigénique de cette dernière. La réponse immunitaire n'apparaîtra, toutes choses étant égales par ailleurs, que si la molécule introduite possède des épitopes distincts de ceux présents sur les molécules constitutives des tissus de l'hôte soumis à l'immunisation : une molécule intrinsèquement immunogène, chez deux hôtes distincts, exprimera sa spécificité selon deux modes différents.

Ceci a été démontré en utilisant comme antigène des copolymères protéiques synthétiques injectés à des souris de lignées pures : ainsi un copolymère formé d'une arête centrale de poly-L-Lysine ayant des chaînes latérales de poly-L-Alanine se terminant par deux acides aminés particuliers, Glutamine et Phenyl-

alanine entraîne une réponse dirigée contre le poly-L-Ala chez les souris de race SJL et contre les acides aminés Phe-Glu- chez les souris de race DBA. La spécificité antigénique est donc indépendante de l'immunogénicité.

II - 7 - Différents types d'antigène:

On peut ainsi distinguer des antigènes :

- **naturels**
- **synthétiques**
- **artificiels** (naturels chimiquement modifiés)

Parmi les antigènes naturels, on distingue des :

- **xénoantigènes** : ce sont des antigènes présents chez tous les individus d'une ou de plusieurs espèces distinctes de celle du sujet immunisé.
- **alloantigènes** : ce sont des antigènes inégalement répartis entre les individus de la même espèce que le sujet immunisé et entraînant la formation d'anticorps chez un individu ne possédant pas l'alloantigène en question.

Chez l'homme on peut citer deux systèmes polymorphes qui tous deux participent à la réponse immunitaire : le complexe majeur d'histocompatibilité et les immunoglobulines. Nous verrons, dans le cas précis des immunoglobulines, que la substitution d'un seul acide aminé suffit pour que la molécule allotypique soit antigénique (cours Immunoglobulines VII-2).

- **autoantigènes** : ce sont des antigènes présents dans les cellules ou les tissus mêmes du sujet immunisé.

La spécificité d'espèce mesure la **distance taxonomique** (c'est-à-dire le degré d'éloignement) entre deux espèces : plus deux espèces sont proches, plus grande est la probabilité des réactions croisées par partage d'épitopes communs ou apparentés sur des molécules constitutives identiques conservées (exemple : albumine humaine et bovine).

*Dans certains cas se développent des anticorps, dits **hétérophiles**, dirigés contre des antigènes présents dans des espèces éloignées. Ainsi l'**antigène de Forssman** est présent sur les érythrocytes de chien, de mouton, de chèvre, de cobaye et de cheval mais pas sur ceux de lapin, de boeuf et humains, à l'exception de ceux des individus de groupe A ou AB.*

On peut retrouver des antigènes spécifiques d'organe, parfois communs à plusieurs espèces différentes qui sont définis par des antisérums absorbés sur des organes différents de celui étudié.

II - 8 - Notion d'immunité :

L'immunité est dite :

- **active** lorsqu'elle est acquise par un organisme suite à l'introduction de l'antigène qui va y induire une réponse immunitaire (vaccination, greffe de moelle osseuse réussie).
- **passive** lorsqu'elle est acquise suite à l'introduction d'effecteurs (anticorps, cellules) préformés (sérothérapie).
- **acquise** lorsqu'elle survient au cours de la vie, même in-utéro, par éducation de clones lymphocytaires.
- **naturelle** lorsqu'elle préexiste à tout contact avec l'antigène étant soit non spécifique, soit spécifique mais acquise de façon inaperçue par réaction croisée (ex. : les anti-A ou les anti-B des groupes sanguins A, B, O).

II - 9 - Notion d'hypersensibilité :

La liaison de l'antigène aux molécules de reconnaissance est le plus souvent insuffisante pour entraîner par l'activation isolée des clones lymphocytaires spécifiques le rejet de l'antigène Ce rejet nécessite l'apport de mécanismes secondaires amplificateurs qui pour beaucoup appartiennent à la réponse immunitaire naturelle : ils ont pour but de libérer des médiateurs solubles et de recruter des cellules souvent responsables de phénomènes **inflammatoires**. L'hypersensibilité décrit les manifestations cliniques déclenchées par le contact antigène/molécules de reconnaissance : dans une réponse immunitaire physiologique ce contact aboutit à l'élimination à bas bruit de l'antigène. Il peut arriver cependant que cette réponse soit mal contrôlée et aboutisse à des manifestations cliniques dont l'expression et le délai d'apparition dépendent de la nature du mécanisme amplificateur. Ceci a permis à GELLS et COOMBS de proposer, en 1967, une classification des états d'**hypersensibilité** en quatre types (voir cours *Introduction* III-14):

*- **hypersensibilité de type I** ou **anaphylactique**, d'apparition immédiate, médiée par les IgE recrutant les polynucléaires basophiles et les mastocytes.*

*- **hypersensibilité de type II** ou **cytotoxique**, d'apparition rapide où la lyse cellulaire fait suite à l'activation du complément ou à l'opsonisation entraînant la phagocytose par les macrophages et la lyse par des cellules tueuses ("killer") par un phénomène de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC).*

*- **hypersensibilité de type III** par **complexes immuns**, d'apparition semi-tardive, recrutant les polynucléaires et le complément.*

*- **hypersensibilité de type IV**, dite **retardée**, mettant en jeu les lymphocytes T capables de recruter d'autres cellules par l'intermédiaire des différentes lymphokines qu'ils sécrètent.*

III - PARAMETRES DU POUVOIR IMMUNOGENE

La notion d'immunogénicité est relative : il faut toujours la définir par rapport à un **hôte** déterminé et des conditions **expérimentales** choisies.

Ainsi un polyoside particulier, SIII, extrait de la capsule du pneumocoque est immunogène chez l'homme et la souris alors qu'il ne l'est pas chez le lapin et le cobaye ; cependant, dans ces deux dernières espèces il se comporte comme un haptène, c'est-à-dire, que l'injection, quelles que soient la technique et la voie d'administration, de la capsule entière déclenche l'apparition d'anticorps anti-SIII.

On voit donc que le pouvoir immunogénique dépend de facteurs intrinsèques ou **paramètres structuraux** liés à la molécule d'antigène, de facteurs liés à **l'organisme** dans lequel on l'introduit et enfin de facteurs liés aux **conditions expérimentales de l'immunisation.**

D'une meilleure connaissance, et donc d'une meilleure maîtrise de ces différents paramètres dépend la mise au point de **vaccins** que l'on espère toujours plus efficaces.

Les progrès dans la connaissance des paramètres du pouvoir immunogène ont suivi ceux des technologies d'analyse des macromolécules organiques : purification et séquençage en acides aminés des peptides, purification et séquençage des polyosides, obtention de peptides et polyosides synthétiques permettant des expériences d'inhibition, cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire, clonage et séquençage des gènes, mutagénèse dirigée et autres apports de la biologie moléculaire.

III.1 - PARAMÈTRES LIÉS À L'ANTIGÈNE :

Ce sont les caractères physico-chimiques de l'antigène qui conditionnent son immunogénicité. Seuls les composés **organiques** peuvent être **immunogènes**.

Les composés **inorganiques** ne sont en principe **pas immunogènes** : au mieux, ils peuvent se comporter comme des haptènes et être néanmoins responsables d'eczéma du cuir chevelu ou de la face par exemple (dermite de contact par réponse cellulaire T), après couplage des radicaux chimiques simples contenus dans certaines teintures capillaires aux

protéines du cuir chevelu ou de la peau du visage. On peut citer comme exemples des sels de métaux lourds (chrome, nickel), des substances végétales ou de nombreux produits chimiques de synthèse, que certains désignent sous le terme de **pro-antigène**.

Parmi les différents paramètres structuraux on distingue :

III - 1-1 La distance taxonomique :

Encore appelée **distance phylogénique** elle correspond au degré d' "étrangeté" entre la molécule d'antigène et la molécule constitutive correspondante de l'organisme receveur. Plus cette distance est grande, autrement dit plus le degré d'éloignement dans l'échelle d'évolution des espèces animales est grand entre l'espèce d'où est extrait l'antigène et celle qui va être immunisée, meilleure est la réponse immunitaire.

Ainsi un antisérum anti-albumine humaine reconnaît bien l'albumine humaine, moyennement celle de singe, peu celle de souris et absolument pas l'ovalbumine. De même certaines protéines, hautement conservées au cours de l'évolution, sont de mauvais immunogènes (ex. : le collagène).

III - 1-2 Paramètres physico-chimiques :

III - 1-2-1 Taille moléculaire :

Plus le volume d'une molécule est grand, plus en principe son pouvoir immunogène est puissant. L'immunogénicité commence pour des édifices moléculaires de taille supérieure ou égale à 3-5 000 Dalton.

On connaît cependant des peptides de taille inférieure et néanmoins immunogène (ocytocine, vasopressine : hormones d'une dizaine d'acides aminés et de 1000 Dalton).

L'**agrégation** éventuelle des antigènes est un paramètre important : ainsi seuls les agrégats d'immunoglobulines, obtenus par la chaleur, sont immunogéniques. Débarrassées des agrégats par ultracentrifugation, et donc sous forme de monomères, les immunoglobulines sont au contraire tolérogéniques.

III - 1-2-2 La rigidité :

Il faut que la structure moléculaire de l'immunogène ne soit pas trop "molle", trop fluide car sinon la fixation sur les récepteurs des lymphocytes qui, nous l'avons vu, repose sur une **complémentarité tridimensionnelle**, est trop lâche voire impossible.

Ainsi la gélatine qui a pourtant un poids moléculaire élevé est un mauvais immunogène ; si on lui ajoute 1 % en poids de radicaux tyrosil qui ont comme effet de la rigidifier, le pouvoir immunogène de cette gélatine substituée est grandement amélioré, avec une spécificité qui varie en fonction du degré de substitution (réponse anti-gélatine pour la gélatine 2 % tyrosil, réponse anti-tyrosine pour une substitution de 10 %).

A l'inverse une certaine mobilité est parfois nécessaire pour permettre le **complémentarité tridimensionnelle**, (bonne congruence épitope/paratope). Les épitopes immunodominants sont le plus souvent les plus mobiles.

III - 1-2-3 La complexité :

Il faut une certaine diversité dans la structure pour obtenir l'immunogénicité.

Ceci a été mis en évidence par l'utilisation de copolymères de synthèse comme ceux décrits précédemment. L'arête centrale isolée de poly-L-Lysine (polymère répétitif monotone d'un seul acide aminé) n'est pas immunogène par elle-même car elle est trop simple dans sa structure. Par contre la greffe de chaînes latérales de poly-L-Alanine, et mieux encore, de chaînes de poly-L-Alanine se terminant par deux autres acides aminés distincts, Phe et Glu, confère une bonne immunogénicité.

III - 1-3 paramètres biochimiques :

III - 1-3-1 Les protéines :

Ce sont les composés **les plus immunogènes**. Les protéines sont des molécules très antigéniques du fait du polymorphisme de leur structure et des différences existant entre espèces, entre individus.

En expérimentation animale on utilise souvent les albumines et les immunoglobulines étrangères. Il faut noter que l'hémoglobine, bien qu'assez grosse molécule avec ses chaînes de globine, est un mauvais immunogène.

III - 1-3-2 Les glucides :

Ils sont immunogènes à l'état de polyosides. Les polysaccharides constituent des édifices moléculaires hautement diversifiés à la structure complexe, et donc fortement antigéniques.

L'intérêt qu'on leur porte vient du fait que leur structure est le plus souvent moins complexe que celle des protéines et qu'ils entrent dans la composition des parois ou des capsules de nombreux microbes (polysaccharides des pneumocoques, lipopolysaccharides [LPS] des colibacilles).

III - 1-3-3 Les lipides :

Par eux-mêmes ils ne sont pas immunogènes, car leur structure est peu ou prou la même dans de nombreuses espèces : ce sont des **haptènes** qui nécessitent le couplage à une protéine porteuse ou à un sucre (glycoprotéine et glycolipide).

Ainsi le cardiolipide, extrait de coeur de boeuf, a été très utilisé dans le sérodiagnostic de la syphilis car il est en réaction croisée avec des antigènes du tréponème. C'est en réalité une substance complexe, lipidoprotidique où le lipide joue le rôle d'haptène.

III - 1-3-4 Les acides nucléiques :

L'ADN pur, isolé, n'entraîne pas de réponse immunitaire expérimentale.

On connaît cependant des maladies (lupus érythémateux aigu disséminé) qui se caractérisent par l'apparition spontanée d'auto-anticorps dirigés contre le propre ADN des patients.

III - 1- 4 Le catabolisme :

Résultant de la conjonction des différents paramètres sus-cités, le catabolisme influe sur l'immunogénicité : plus il est lent, plus la stimulation antigénique perdure et plus l'immunogénicité croît.

III - 1- 5 Valence antigénique :

Au terme de cette étude des paramètres structuraux d'une molécule d'antigène on peut définir la **valence antigénique** comme le nombre d'anticorps capable de se lier simultanément à un antigène. Celui-ci peu être vu comme la juxtaposition de plusieurs épitopes différents, capables chacun d'induire la formation d'un anticorps spécifique. La valence est au mieux égale à la somme des épitopes et le plus souvent lui est inférieur notamment pour les molécules de haut poids moléculaire en raison de phénomènes d'encombrement stérique. Sur le tableau ci-dessous on peut voir que l'accroissement de la valence n'est pas directement proportionnel au poids moléculaire :

Protéine	*Poids moléculaire (kD)*	*valence antigénique*
Myoglobine	17	3
Sérum albumine	70 (x 4,1)	6 (x 2)
Thyroglobuline	650 (x 9,3)	40 (x 6,7)
Hémocyanine	6 500 (x 10)	75 (x 1,9)
Virus de la mosaïque du tabac	40 000 (6,15)	800 (x 11)

III - 2 Paramètres liés à l'hôte :

III - 2 - 1 Gènes Ir :

Depuis les travaux de Benacerraf au début des années soixante on sait que certains animaux et même certains individus au sein d'une même espèce répondent mieux que d'autres à une stimulation donnée. Ayant observé ce caractère héréditaire incontestable de la réponse immunitaire Benacerraf avait postulé l'existence de **gènes de réponse immunitaire** (**gènes Ir**) que les études ultérieures ont identifiés comme étant, en grande partie, les **gènes du CMH de classe II**.

En effet de la plus ou moins grande faculté de liaison des peptides aux antigènes HLA de classe II dépend la plus ou moins grande capacité de présentation aux lymphocytes T et par là, l'induction de la réponse immunitaire. Il existe cependant d'autres gènes non situés sur le chromosome 6 et moins individualisés qui modulent aussi la réponse immunitaire.

III - 2 - 2 Age :

L'âge de l'individu soumis à l'immunisation, conditionne, via l'état de développement physiologique de son système immunitaire, la qualité de la réponse immunitaire. Il est en effet bien connu qu'il est plus facile d'obtenir un état de **tolérance** chez des animaux **nouveau-nés**.

III - 3 Paramètres liés aux conditions d'immunisation :

III - 3 - 1 Dose d'immunogène :

Pour des doses extrêmement faibles, de l'ordre du nanogramme s'installe un état de non-réponse, encore appelé **tolérance aux faibles doses** qui est un phénomène actif, spécifique. Lors d'un deuxième contact avec le tolérogène, dans des conditions expérimentales d'immunisation normale (c'est-à-dire capable d'induire la production d'anticorps) l'organisme ne peut répondre alors qu'il en est tout à fait capable vis-à-vis d'un antigène différent administré la première fois, à des doses normales.

Pour une dose plus importante, de l'ordre du microgramme on aura encore une apparence de réponse nulle mais en fait l'animal commence à préparer son système immunitaire (réaction cellulaire isolée) : si on refait la même injection de la même dose un mois plus tard on verra cette fois une véritable réponse immunitaire. A ces faibles doses peu d'anticorps sont produits, mais ils sont de haute affinité et de forte spécificité et parfois d'isotypes particuliers, notamment IgE chez l'homme et IgG1 chez le cobaye, responsables d'hypersensibilité immédiate. On observe de grande variation dans les doses minimales inductrices en fonction de la nature des antigènes : ainsi chez les rongeurs il faut 10^{-4} grammes d'albumine bovine pour voir apparaître une réponse immunitaire alors que 10^{-14} grammes d'endotoxines y suffisent.

Pour des doses supérieures de l'ordre du milligramme et plus, la réponse augmente avec la dose mais de manière non proportionnelle. Lorsque les doses deviennent trop importantes on observe un état de tolérance d'abord partiel, puis total, que l'on qualifie de **paralysie immunitaire**.

III - 3 - 2 Voies d'administration :

La voie d'administration dicte la localisation du **contact** de l'antigène avec les cellules immunocompétentes. Lors d'une immunisation par voie intra-dermique, sous-cutanée ou intra-musculaire l'antigène est retrouvé dans les ganglions régionaux de drainage. Lors d'une immunisation par voie intra-veineuse, ou intra-péritonéale chez les petits rongeurs, l'organe lymphoïde sollicité est surtout la rate.

La voie **intra-veineuse** tend à entraîner un état de **tolérance**. Les meilleures voies pour une réponse immunitaire positive, notamment une bonne production d'anticorps, sont les voies sous-cutanées, intra-musculaire et intra-dermique (coussinet plantaire).

La voie d'administration peut modifier le caractère immunogénique d'une substance : ainsi le polymère poly D, L-Alanine (branchement d'alanine dextrogyre et lévogyre) est non immunogénique chez le lapin, à l'exception de l'immunisation par voie intra-dermique en différents endroits.

L'administration à deux ou trois jours d'intervalle de deux antigènes différents entraîne une dépression de la réponse vis-à-vis du deuxième antigène : ce phénomène est connu sous le nom de **compétition antigénique.**

III - 3 - 3 Adjuvants :

La plupart des protéines sont peu immunogènes. Pour déclencher une forte réponse immunitaire un antigène protéique doit être injecté en association avec un mélange appelé **adjuvant**. Ce sont des substances inertes, non immunogènes qui augmentent la réponse immunitaire de l'individu, tant humorale que cellulaire, lors de leur administration simultanée avec l'antigène, en favorisant une réaction inflammatoire.

Ils agissent essentiellement en transformant les antigènes solubles en matériel particulaire, ce qui favorise leur **captation** par les cellules présentatrices et leur **libération**

plus lente par ces dernières : tout ceci aboutit à augmenter le temps de contact entre l'antigène et les cellules immunocompétentes.

Contrairement aux protéines porteuses l'adjuvant ne forme pas de liaisons stables avec l'immunogène. De même sa présence n'est requise qu'au début de l'immunisation, alors que le couplage haptène-protéine porteuse est nécessaire aussi bien pour la réponse primaire que pour la réponse secondaire.

*En expérimentation animale l'adjuvant le plus employé est **l'adjuvant complet de Freund** qui est interdit chez l'homme : il s'agit d'un mélange d'huile minérale, d'agent émulsifiant et de mycobactéries tuées (voisines du BK). La solution immunogène mélangée avec cet adjuvant forme une sorte de crème qu'on injecte par voie sous-cutanée ou intra-dermique. Les ISCOMs ("immune stimulatory complexes") sont de petites micelles d'un détergent, le Quil A. Ces micelles dans lesquelles sont empaquetées des protéines virales fusionnent avec la membrane plasmique des cellules présentatrices d'antigène: l'antigène peut alors pénétrer dans le cytosol et stimuler une réponse immunitaire, comme le ferait un virus infectant la cellule.*

Chez l'homme pour les vaccinations, on utilise principalement le phosphate de calcium ou l'hydroxyde d'alumine. L'antigène forme une sorte de film très dispersé à la surface de ces particules inertes.

III - 3 - 4 Nature de l'immunisation :

La qualité et la quantité des anticorps produits varient selon la nature, **primaire** ou **secondaire**, de l'immunisation : l'isotype change (commutation IgM/IgG) et la spécificité et l'affinité augmentent lors du passage à la réponse secondaire (cf cours *Introduction* III-13).

III - 4 Notion d'antigènes thymo-dépendants et thymo-indépendants

En fonction de la nécessité ou non de l'aide des lymphocytes T pour la production d'anticorps on distingue des immunogènes **thymo-dépendants** et des immunogènes **thymo-indépendants**. La plupart des antigènes naturels sont thymo-dépendants.

On connaît cependant une minorité d'antigènes dits **thymo-indépendants** capables de solliciter directement les lymphocytes B après fixation à leur récepteur de surface. Il s'agit le plus souvent d'édifices de haut poids moléculaire de structure **répétitive** d'un ou de quelques épitopes, souvent de nature **polyosidique** et de **catabolisme lent**.

Deux types d'antigènes thymo-indépendants sont décrits. Les antigènes thymo-indépendants de **type 1** possèdent des caractéristiques physicochimiques qui en font à fortes doses des stimulateurs de tous les lymphocytes B, immatures et matures. On parle alors de **mitogènes**.

*La prolifération et la différenciation observées sont le résultat d'une stimulation polyclonale, contrairement à celle consécutive au contact avec un antigène spécifique. On qualifie de telles substances de **mitogènes**, et certaines, purifiées, sont utilisées in vitro pour stimuler les lymphocytes B (par exemple le pokeweed mitogen). Dans le déroulement normal d'une infection, la quantité d'antigène thymo-indépendant de type 1 est trop faible pour que les effets mitogènes se manifestent. L'antigène n'est alors capable de stimuler que les lymphocytes B spécifiques, car les immunoglobulines de surface de ce dernier le concentre alors sur ces cellules. Cependant en l'absence de collaboration des lymphocytes T aucune commutation isotypique, ni maturation d'affinité, ni génération de lymphocyte B mémoire n'est possible.*

Ceci explique les caractéristiques de la réponse immunitaire aux antigènes thymoindépendants : réponse de type **IgM**, de **faible affinité sans cellules mémoire**.

Les antigènes thymoindépendants de **type 2** sont des polysaccharides à structure répétitive, retrouvés dans les parois bactériennes. Ils sont dénués d'activité mitogène et ne peuvent stimuler que des lymphocytes B matures.

Une telle structure en peigne est suffisante pour s'attacher à un nombre important d'immunoglobulines membranaires à la surface du lymphocyte B avec pour résultat l'obtention d'un signal d'activation suffisamment fort pour qu'il n'y ait pas besoin d'un deuxième signal d'activation fournit par les

lymphocytes T sous forme de médiateur soluble à cours rayon d'action nécessaire lorsque peu d'Ig de surface sont engagées dans des complexes avec un antigène thymo-dépendant aux épitopes multiples, différents et donc moins représentés. Le catabolisme lent explique la quasi ***absence de cellules mémoire*** *lors d'une réponse immunitaire dirigée contre un antigène thymo-indépendant ainsi que* ***l'absence de commutation*** *de classe, l'isotype majeur étant l'IgM.*

En raison de ces données structurales il est aisé de comprendre que les ***protéines*** *sont* ***thymo-dépendantes*** *à l'exception de certaines, très polymérisées, comme la flagelline, extraite de Salmonella adélaïde qui sont thymo-indépendants. De même les polypeptides synthétiques, au catabolisme très rapide, sont thymo-dépendants, à l'exception de leurs formes dextrogyres dont le catabolisme est lent et qui sont thymo-indépendants. Les polysaccharides, à la structure répétitive et au métabolisme lent, tels qu'on en trouve dans les parois ou les capsules des micro-organismes, sont typiquement des antigènes thymo-indépendants. Les haptènes artificiellement conjugués à des polymères thymo-indépendants sont thymo-indépendants : la thymo-indépendance n'est donc pas liée à un registre d'épitopes particuliers mais bien à un certain type de configuration spatiale qui permet une activation directe du lymphocyte B.*

Citons comme antigènes **thymo-indépendants de type 1** :

- lipopolysaccharides
- flagelline polymérisée
- polyvinylpyrrolidone

et antigènes **thymo-indépendants de type 2** :

- polysaccharides solubles (ex : polysaccharide S III du pneumocoque)
- dextrans
- levanes
- TNP-Ficoll
- polymères synthétiques d'acides aminés lévogyres

IV - ANTIGENICITE

IV - 1 ANTIGÈNES POLYOSIDIQUES :

Ce sont des antigènes de structure simple comparés aux protéines eu égard au rôle faible des structures secondaire ou tertiaire dans leur immunogénicité. Il s'agit le plus souvent de **déterminants séquentiels**, c'est-à-dire faits de la succession de plusieurs oses (pentoses, hexoses ou heptoses) plus ou moins substitués par des radicaux méthyl, acétyl, amine ou N-acétylamine sur un groupement-OH.

La réduction (composés désoxy), l'oxydation (obtention d'acide uronique), l'existence d'énantiomères (dextrogyre ou lévogyre) et de liaison anomériques 9 *ou* 9 *participent à leur immunogénicité. On parle d'****oligosides*** *pour des édifices moléculaires de 10 à 12 oses et de* ***polyosides*** *pour une taille supérieure. Dans ce cas la structure peut être linéaire, branchée ou arborescente.*

Les polyosides ne sont pas directement immunogènes chez le lapin et, pour certains, sont thymo-indépendants chez l'homme et la souris.

Parmi les polyosides complexes on range les **lipopolysaccharides** (LPS) des entérobactéries, les **glycoprotéines**, les **lectines.**

Ainsi le sérotype des salmonelles est déterminé par la composition du LPS qui comprend une partie lipidique, le lipide A possédant les propriétés endotoxiniques, relié par une région dite région II constituée d'oligosaccharides monomorphes à une région I qui contient des unités répétitives d'oligosaccharides polymorphes porteurs des déterminants antigéniques des sérotypes O. Un sérogroupe est défini par l'association de plusieurs déterminants antigéniques (ex; : sérogroupe A de S. parathyphi A = déterminants 1, 2 et 12). Des expériences d'inhibition par des haptènes ont permis à KABAT *de déterminer la taille des épitopes oligosidiques (six à sept sucres) ainsi que les spécificités antigéniques de certains sérotypes O de salmonelle (ex.* 9*-D-Glu (1*1*6)9-D Gal pour le système 1-anti-1).*

On définit un **sucre immuno-dominant** comme étant celui qui parmi les sucres constitutifs d'un polyoside possède le pouvoir inhibiteur le plus fort dans des expériences d'inhibition hapténique. De tels sucres immuno-dominants sont le plus souvent situés à l'extrémité des chaînes latérales et sont le principal point de contact de l'épitope avec le site de combinaison de l'anticorps, participant donc le plus à l'énergie de la liaison antigène-anticorps. Tous les sucres d'un polyoside ne sont pas immunogènes ; soit parce qu'ils possèdent des structures communes avec des auto-antigènes (notamment sur les érythrocytes) ; soit parce qu'ils ont une structure si instable que leur catabolisme est accompli avant même l'enclenchement de la réponse immunitaire ; soit parce qu'il y a compétition antigénique entre les sucres.

*Les **groupes sanguins A, B, O** et **AB** sont un exemple d'antigènes polyosidiques naturels complexes étudiés à partir de la salive chez les sujets sécréteurs, à partir du liquide de kystes de l'ovaire qui contiennent des grandes quantités de ces groupes sanguins et plus difficilement à partir des membranes de globules rouges proprement dits.*

Les travaux de LANDSTEINER, au début du siècle, ont conduit aux deux règles fondamentales de la transfusion :

- sur les globules rouges deux antigènes, A et B, peuvent être absents ou présents, séparément ou simultanément, définissant respectivement les sujets de groupe O (pour "Ohne", sans), A, B et AB.

- dans le sérum d'un individu il existe toujours le (ou les) anticorps dirigés contre le (ou les) antigènes que l'individu ne possède pas : anti-A chez un sujet B, anti-B chez un sujet A, anti-A et anti-B chez un sujet O. Seuls les sujets AB n'ont pas d'anticorps et sont dits receveurs universels.

*Ces anticorps sont dits **naturels** car ils sont présents dès la naissance. Ils résultent d'une immunisation croisée par partage d'épitopes communs entre les bactéries saprophytes intestinales et les substances de groupes A et B. Les hétéro-anticorps anti-bactéries développés à la naissance se révèlent être aussi des allo-anticorps dans le système transfusionnel.*

Les gènes A et B codent pour des glycosyl-transférases. Les épitopes spécifiant chaque groupe sanguin sont des sucres complexes attachés à une molécule de base commune à l'ensemble des quatre groupes. Cette substance de base, appelée substance pneumocoque XIV (SP XIV) car ressemblant à certains polysaccharides des pneumocoques, est un sphingolipide complexe de la membrane du globule rouge.

La synthèse du SP XIV et celle du fucose dépendent du gène H. L'addition des radicaux N-acétyl galactosamine ou galactose dépend des gènes A ou B. Il existe de très rares individus qui ne possèdent pas les gènes H : ils sont dits du phénotype Bombay, mais ils possèdent les gènes A ou B ne pouvant cependant pas les exprimer en l'absence de gènes H.

Groupe O :SP XIV + fucose (substance H)

Groupe A :SP XIV + fucose + N-acétylgalactosamine (substance A)

Groupe B :SP XIV + fucose + galactose (substance B).

Le système immunitaire est donc particulièrement discriminant puisqu'il est capable de reconnaître une différence qui ne porte que sur un seul sucre.

*Un deuxième exemple d'antigène polyosidique d'intérêt est celui de l'**antigène galactosyl** (Gal9113 Gal). Ce sucre est le produit de l'enzyme galactosyltransférase qui est inactive chez l'homme et certains primates, alors qu'elle est parfaitement fonctionnelle dans le reste du règne animal et chez les procaryotes. Dès les premières années de la vie l'homme s'immunise contre cet épitope : on estime que 1 % de nos IgM sont des anticorps anti-galactosyl, constituant un des obstacles majeurs aux xénogreffes.*

IV - 2 - ANTIGÈNES PROTÉIQUES RECONNUS PAR LES ANTICORPS :

Les protéines et les polypeptides sont des immunogènes le plus souvent **thymo-dépendants**. Des traitements physiques (chaleur), chimiques capables de modifier leur conformation sont susceptibles de modifier leur immunogénicité. Ce n'est cependant pas toujours le cas puisque le formaldéhyde abolit la toxicité des toxines bactériennes tout en en gardant l'immunogénicité permettant ainsi la fabrication de vaccins à l'aide des **anatoxines** ainsi obtenues.

Les protéines naturelles sont difficiles à étudier car elles possèdent de nombreux épitopes. Elles l'ont d'abord été après traitement chimique ou hydrolyse enzymatique permettant d'obtenir des peptides naturels. L'apport des anticorps monoclonaux, des peptides de synthèse, de la mutagénèse dirigée permettent actuellement d'affiner ces résultats.

Rapidement on s'est aperçu que des modifications chimiques, qui altèrent la conformation spatiale, modifie l'immunogénicité.

Ainsi, pour les gammaglobulines, plus l'agrégation augmente, plus l'immunogénicité augmente : des gammaglobulines dépourvues d'agrégats sont tolérogéniques (cf III-1-2-1). La dénaturation, le vieillissement diminue l'immunogénicité.

Déjà en 1942 LANDSTEINER en utilisant la protéine fibrillaire de la soie démontrait, par des réactions d'inhibition utilisant des peptides d'hydrolyse, que la taille de la **région immunopotente** (conditionnant l'immunogénicité de manière globale par rapport aux structures fines qui déterminent la spécificité) était d'environ huit acides aminés. De plus il observait que l'acide aminé terminal du peptide avait un rôle critique : la substitution de la tyrosine terminale diminuait de moitié le pouvoir inhibiteur dans ce cas précis.

SELA dans les années 1960, étudiant le lysozyme du blanc d'oeuf, petit peptide d'environ 14 kD avec quatre ponts disulfure constatait que la réduction (dissociation des ponts disulfure) abolissait la réaction antigène-anticorps. Les épitopes reconnus n'existaient sur la molécule que dans sa configuration native, dépendant donc de la structure tridimensionnelle. Il les nommait **épitopes conformationnels** par opposition aux seuls épitopes connus à l'époque, dits **séquentiels** et résultant de l'enchaînement des acides aminés.

Les travaux ultérieurs utilisant d'autres protéines (ribonucléase, albumine humaine, myoglobine du cachalot) ont confirmé que des acides aminés éloignés dans la structure primaire sont proches dans la structure tertiaire et participent ainsi à la constitution d'épitopes conformationnels. On a montré également que la nature des déterminants immunogéniques peut varier selon les combinaisons d'espèces.

Dans quelques cas privilégiés l'apport de la cristallographie aux rayons X a permis de préciser que la surface de contact entre l'épitope et le site de combinaison de l'anticorps (paratope) était d'environ 8 à 900 $Å^2$, comprenant 15 à 22 acides aminés répartis sur 2 à 4 segments polypeptidiques. La complémentarité précise entre l'épitope et le paratope est assurée par des changements conformationnels : il est reconnu que les déterminants antigéniques majeurs (immunodominants) sont ceux qui sont exposés en surface, et ont donc la plus grande mobilité, et donc la capacité d'adaptation au paratope.

L'utilisation de polypeptides synthétiques a permis d'évaluer les conséquences sur l'antigénicité de la composition en acides aminés, de leur position spatiale, de leur charge électrique, de leur configuration optique. Elle a permis de préciser (cf supra) qu'un certain degré de complexité moléculaire était indispensable puisqu'en règle générale les homo-polymères sont non immunogènes à l'exception de la poly-L-lysine dans certaines souches de cobaye (travaux de BENACERRAF sur les gènes Ir). De même la position spatiale qui dicte l'accessibilité, est un facteur critique de l'immunogénicité. Sur un copolymère comme celui précédemment décrit (cf. supra) de poly-L-Lys-poly-Ala-Tyr-Glu la réponse anti Tyr-Glu n'existe que si ces deux acides aminés sont à l'extrémité de chaînes latérales (poly Ala) rapprochées ou à l'origine de chaînes latérales espacées, donc accessibles dans les deux cas.

Contrairement aux protéines natives, pour lesquelles l'immunogénicité est proportionnelle à la taille, les polypeptides de synthèse se révèlent de bons immunogènes à partir de 4000 daltons et ce sans rapport aussi direct avec la taille.

Les copolymères de forme lévogyre d'acides aminés sont très immunogènes et thymo-dépendants alors que ceux qui sont dextrogyres sont peu immunogènes et thymo-indépendants. L'influence de la position spatiale et l'accessibilité est montrée par le fait qu'un copolymère mixte fait de 95 % d'acides aminés lévogyres avec cependant 5 % d'acides aminés dextrogyres à l'extrémité des chaînes latérales, donc très accessibles, est peu immunogène.

Les conclusions de tous ces travaux sur l'antigénicité des protéines pour la réponse humorale sont les suivantes : l'immunogène doit avoir une **taille minimale** (1000 Daltons), présenter une certaine **complexité moléculaire**, posséder **plusieurs déterminants** dont la

taille est d'environ **10 à 20 acides aminés** et qui doivent être **accessibles**. Ce sont plus souvent des déterminants **conformationnels** que **séquentiels** qui doivent présenter un certain degré de **mobilité** pour augmenter la complémentarité antigène-anticorps. La nature des acides aminés avec leur noyau dicte ainsi, par le biais du caractère d'hydrophobicité leur position dans la chaîne repliée et par leur chaînes latérales le degré de mobilité.

Bien qu'il n'y ait pas de règle absolue il existe maintenant des logiciels avec des algorithmes, faisant intervenir ces nombreux paramètres, qui permettent de prédire, à partir de la séquence primaire d'une protéine, les sites potentiellement immuno-dominants, ce qui a des implications pour la réalisation des vaccins

IV- 3 - Epitopes T des protéines et des peptides :

Contrairement aux lymphocytes B qui reconnaissent des antigènes de nature différente (protéines, lipides, polysaccharides, ADN), les lymphocytes T ne reconnaissent essentiellement, à de rares exceptions près, que des antigènes issus de **protéines**. De plus, alors que les lymphocytes B reconnaissent le plus souvent des épitopes conformationnels, donc présents sur des molécules d'antigène sous leur forme native, les lymphocytes T ne reconnaissent que des peptides, donc des épitopes **séquentiels**, présentés par les produits des gènes de classe I et II du CMH.

L'étude des épitopes T des protéines reposent sur l'induction in vivo de réponse immunitaire cellulaire (rejet d'allo-greffe, hypersensibilité retardée), l'analyse in vitro de la réponse proliférative aux peptides des lymphocytes T d'animaux immunisés, et celle de la spécificité des clones et hybridomes T obtenus.

On sait désormais que les épitopes T sur les protéines sont moins nombreux que les épitopes B et qu'ils en sont le plus souvent distincts même si des chevauchements sont parfois possibles. Ce sont le plus souvent des déterminants **séquentiels** et parfois même la réponse proliférative est aussi intense avec le peptide qu'avec l'antigène entier. L'impact de la structure tertiaire ne s'exerce que par l'influence qu'elle a sur le catabolisme protéique et la sélection ainsi entraînée des épitopes. Ils s'organisent autour de résidus critiques que l'on nomme acide aminé **immunodominant** et la taille de ces séquences est d'environ 10 à 12 acides aminés.

Ceci a été confirmé par élution de peptides à partir des molécules du CMH : on retrouve une taille de 9 acides aminés pour ceux élués des molécules de classe I, et de 13 à 17 acides aminés pour ceux élués des molécules de classe II.

Il existe au moins deux sites fonctionnels de liaison sur les déterminants antigéniques reconnus par les lymphocytes T : l'**épitope** qui se lie au TCR au niveau du **paratope** ; **l'agrétope** qui se lie à la molécule HLA au niveau du **désotope**.

Ainsi pour la réponse au cytochrome C chez la souris on a localisé l'épitope immunodominant au niveau de la lysine 99 et l'agrétope au niveau de l'alanine 103. La conséquence en est que des peptides dérivant d'une même protéine peuvent avoir différentes restrictions au CMH, dues à leur capacité de liaison différente à diverses molécules du CMH.

La présence d'un même acide aminé au site immunodominant sur des molécules d'espèces différentes explique les **réactions croisées** observées (prolifération de lymphocytes T murins sensibilisés à la myoglobine de cachalot avec des myoglobines d'espèces différentes ayant aussi une glutamine en position 109). Dans ce même modèle l'étude de clones T spécifiques a permis d'identifier les acides aminés responsables de la restriction H2 de la réponse, donc les agrétopes : la restriction à I-A^d dépend de la glutamine 109 et celle à I-E^d de la lysine 140.

Il existe également des **déterminants cryptiques** totalement inaccessibles sur la molécule native ; de tels déterminants n'entraînent une prolifération *in vitro* que des lymphocytes T sensibilisés *in vivo* avec le peptide et non avec la protéine entière.

On a montré que la capacité de stimuler des clones T était en corrélation avec la capacité des peptides à former des hélices 9 , ce qui est à rapprocher de la structure du site de liaison du peptide sur le CMH, constitué de deux hélices 9 anti-parallèles séparées par une gouttière au fond, fait de feuillets 9 où se loge le peptide.

Un deuxième facteur qui gouverne l'immunodominance T est l'**amphipathicité** ou capacité de présenter des régions hydrophiles et hydrophobes : elles interviendraient en stabilisant le peptide dans la gouttière du CMH, en le protégeant contre la protéolyse, en facilitant son incorporation dans les membranes et en favorisant une structure alpha hélicoïdale.

Enfin, dernier facteur, il a été montré que la présence de résidus chargés (lysine) près de l'extrémité C-terminale favorisait les liaisons au CMH.

IV - 4 - SUPERANTIGÈNE

A la différence des antigènes protéiques classiques, les super-antigènes ne nécessitent pas d'être apprêtés (tronçonnés en oligopeptides) pour se lier au TCR.

On appelle ainsi des molécules capables de se lier, sur leur versant externe, à des molécules de classe II du CMH et aux chaînes 9 du TCR. Cette liaison est donc distincte de celle provoquée par le peptide antigénique. L'activation qu'elles entraînent est donc **polyclonale**, et intéresse un plus grand pourcentage (10 à 15 %) de lymphocytes T que celle spécifique médiée par l'antigène. Certaines entérotoxines de staphylocoques, à l'origine de toxi-infection alimentaire ou de syndrome de choc, se comportent comme des superantigènes. Les superantigènes ne sont pas impliqués dans les mécanismes de défense vis-à-vis des agents pathogènes, mais dans la genèse des mécanismes immunopathologiques.

Il existe également des molécules d'origine bactérienne (protéines A et G du Staphylocoque) capable de se lier au BCR indépendamment du site anticorps et d'activer de façon polyclonale les lymphocytes B.

V - CONCLUSION

Les molécules étrangères (antigènes) sont constituées, à leur surface principalement, d'une mosaïque de déterminants antigéniques (épitopes) reconnus spécifiquement par les lymphocytes B et les lymphocytes T. Dans le cas des antigènes thymodépendants, le plus fréquent, il faut qu'il y ait au minimum deux épitopes, l'un "hapténique" reconnu par les lymphocytes B, l'autre de type "porteur" reconnu par les lymphocytes T. Le déterminant T porte aussi un site de liaison pour le CMH (agrétope) dont l'absence explique, chez la souris, l'existence de lignées non-répondeuses à certains antigènes. Pour des raisons de physiologie de la réponse immunitaire les épitopes B sont plutôt conformationnels et les épitopes T plutôt séquentiels. Dans tous les cas l'hydrophobicité, le degré de mobilité, la rapidité du catabolisme sont des facteurs prédominants de l'immunogénicité. Désormais ils sont tous à prendre en considération lors de la mise au point d'un vaccin que l'on espère efficace, c'est-à-dire susceptible d'induire une protection par la mise en place d'une réponse humorale et cellulaire.

RESUME

Les molécules étrangères sont appelées antigènes et se lient spécifiquement aux molécules de reconnaissance produites par les lymphocytes B et T, que sont respectivement les immunoglobulines de surface et le récepteur T (TCR). L'antigène ne peut donc être défini que par rapport à un hôte receveur. L'immunogénicité, ou capacité pour un antigène d'induire une réponse immunitaire, dépend donc à la fois de l'antigène, du receveur et des conditions d'immunisation. Les antigènes sont constitués, principalement à leur surface, d'une mosaïque de déterminants antigéniques, ou épitopes, reconnus spécifiquement par les paratopes des immunoglobulines pour les lymphocytes B ou par le TCR pour les lymphocytes T. La plupart sont thymo-dépendants, nécessitant la coopération des deux sous-populations de lymphocytes pour une parfaite prise en charge par le système immunitaire. Ceci se traduit par l'existence d'épitopes B, de type hapténique et plutôt de nature conformationnelle, et d'épitopes T, de type "porteur" et de nature séquentielle. Ces épitopes T, de plus, portent aussi des sites de liaison pour les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, ce qui explique l'existence des gènes de réponse immunitaire. Tous les paramètres qui concourent à un meilleur et plus durable temps de contact épitope-paratope augmentent l'immunogénicité et sont donc des facteurs à prendre en considération pour l'obtention de vaccins efficaces (hydrophobicité, taille moléculaire, degré de mobilité, rapidité du catabolisme de l'immunogène, ...)

POUR EN SAVOIR PLUS:

BACH JF Antigènes in BACH JF *Immunologie : de la biologie à la clinique.* Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 41-49

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 93-108

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2001 : 33-45

TESTER-VOUS

1 - L'haptène

A: est immunogène
B: doit être couplé à un "porteur" pour induire une réponse immunitaire
C: est une grosse molécule
D: est capable de se lier aux immunoglobulines de surface
E: est toujours un polysaccharide

2 - L'haptène :

A - est immunogène intrinsèquement
B - est une grosse molécule
C - est capable de se lier aux immunoglobulines de surface
D - est toujours un allergène
E - est le plus souvent de faible poids moléculaire

3 - Un haptène :

A – induit toujours une réponse immunitaire
B - doit être obligatoirement couplé à une molécule porteuse pour induire une réponse immunitaire
C - induit toujours une réponse de type tolérogène
D - peut réagir avec un anticorps spécifique
E - ne stimule que les lymphocytes T

4 - L'épitope

A: est encore appelé haptène
B: se lie au paratope de l'anticorps
C: est encore appelé déterminant antigénique
D: se lie aussi au désotope de l'antigène HLA pour les épitopes T
E: est le plus souvent séquentiel pour les épitopes B

5 - Les assertions suivantes concernent les épitopes :

A: ils sont équivalents à des déterminants antigéniques
B: ce sont les sites anticorps portés par les molécules d'immunoglobulines
C: ils sont souvent multiples et différents sur une macromolécule immunogène
D: ils sont pratiquement analogues aux idiotypes
E: ils peuvent être conformationnels ou séquentiels

6 - L'adjuvant complet de Freund

A: contient des mycobactéries vivantes
B: contient de l'huile minérale
C: forme des liaisons stables avec l'antigène
D: favorise la captation de l'antigène par les cellules présentatrices de l'antigène

E: accélère le catabolisme de l'antigène

7 - Les antigènes sont appelés

A: alloantigènes, lorsqu'on les retrouve chez un seul sujet
B: xénoantigènes, lorsqu'on les retrouve dans plusieurs espèces
C: xénoantigènes, lorsqu'ils sont inégalement répartis au sein d'une même espèce
D: autoantigènes lorsqu'ils ne sont pas immunogéniques
E: alloantigènes, lorsqu'ils définissent des sous-populations au sein d'une espèce donnée

8 - Les antigènes thymo-indépendants

A: sont le plus souvent de nature protéique
B: sont le plus souvent de nature saccharidique
C: ont un catabolisme lent
D: donne une réponse humorale principalement de classe IgG
E: sont plus rapidement rejetés lors d'une deuxième stimulation

9 - Les antigènes thymo-indépendants:

A - ne nécessitent pas l'aide du lymphocyte T pour la production par le lymphocyte B d'anticorps dirigés contre eux
B - entraînent une réponse anticorps de classe IgE
C - sont doués de propriétés mitogéniques pour ceux de type 1
D - sont souvent de nature polyosidique
E - ont un catabolisme rapide

10 - Une substance est dite immunogène :

A - quand elle peut induire une réponse immunitaire
B - si elle doit être obligatoirement couplée à une molécule porteuse pour induire une réponse immunitaire
C - si elle nécessite l'aide des lymphocytes T pour induire une réponse immunitaire
D - quand elle peut réagir avec un anticorps spécifique
E - si elle ne stimule que les lymphocytes T

LES ORGANES DE L'IMMUNITÉ

I - INTRODUCTION

II - ORGANES LYMPHOIDES CENTRAUX

II-1 - La moelle osseuse

II-2 - La bourse de Fabricius

II-3 - Le thymus

II-3-1- Mise en évidence du rôle du thymus
II-3-2- Anatomie
II-3-3- Ontogénie
II-3-4 Organisation fonctionnelle

III - ORGANES LYMPHOIDES SECONDAIRES

III-1 - Tissus lymphoïdes diffus

III-2 - Les follicules lymphoïdes solitaires

III-3 - Les ganglions lymphatiques

III-3-1- Architecture du ganglion lymphatique
III-3-2- Le centre clair germinatif du ganglion

III-4 - La rate

III-4-1 Ontogénie
III-4-2 Anatomie

III-5 - Les formations lymphoïdes annexées aux muqueuses

III - 5 - 1 - Les amygdales
III - 5 - 2 - Les plaques de Peyer
III - 5 - 3 - L'appendice iléo-caecale
III - 5 - 4 - Le système immunitaire cutané
III - 5 - 5 - Les séreuses
III - 5 - 6 - Les sites effecteurs : lamina propria et lymphocytes intra-épithéliaux

IV - L'ECOTAXIE (ou "HOMING")

IV-1 Description

IV-1-1 La recirculation
IV-1-2 Les cellules endothéliales cubiques des veinules post-capillaires
IV-1-3 Mise en évidence du phénomène d'écotaxie

IV-2 Bases moléculaires

IV-2-1 Sélectines
IV-2-1-1 Structure
IV-2-1-2- Ligands
IV-2-2 Chémokines et CD 44
IV-2-3 β2- et β1-Intégrines
IV-2-3-1 β2-Intégrines

IV-2-3-2 VLA-4 et son ligand VCAM-1

IV-2-2-5 Autres interactions moléculaires

IV-3 RÉGULATION

LES ORGANES DE L'IMMUNITÉ

Niveau A :

- **Organes lymphoïdes primaires, secondaires : définition, fonctions, distinction**
- **Organes lymphoïdes primaires : acquisition du répertoire, de la tolérance, antigène indépendance**
- **Cellules souches hématopoïètiques : totipotence, auto-renouvellement**
- **Follicule lymphoïde primaire, secondaire**
- **Centre clair germinatif**
- **Zones B- et T-dépendantes du ganglion, de la ratespécificités du système immunitaire muqueux (IgA, plaques de Peyer, lymphocytes intra-épithéliaux)**
- **Mécanismes généraux de la circulation des lymphocytes**
- **Liste et fonctions des sélectines, intégrines, adressines**

Niveau B :

- **Structure des sélectines, intégrines, adressines**
- **Conséquence de la bursectomie, thymectomie**
- **Maladie de Bruton**
- **Syndrome de Di George**

LES ORGANES DE L'IMMUNITÉ

I - INTRODUCTION

Pour optimiser les interactions cellulaires indispensables aux étapes de reconnaissance, d'activation et effectrice de la réponse immunitaire la plupart des cellules immuno-compétentes sont regroupées dans des organes lymphoïdes connectés entre eux et à la circulation sanguine générale. Le système lymphoïde forme donc un réseau au sein duquel les cellules sont en perpétuelle circulation, ce qui explique que la structure anatomique des organes lymphoïdes ne soit pas fixe bien qu'on y distingue des aires de répartition spécifique en fonction de l'origine des cellules (lymphocytes T ou B).

On distingue deux catégories d'organes lymphoïdes : les organes lymphoïdes **primaires** ou **centraux** et les organes lymphoïdes **secondaires** ou **périphériques**. Les précurseurs lymphocytaires subissent leur maturation au contact du micro-environnement des organes lymphoïdes primaires **indépendamment de la présence des antigènes.** Les lymphocytes matures fonctionnels qui en ressortent colonisent les organes lymphoïdes secondaires qui sont placés sur les voies de pénétration des antigènes dans l'organisme. Leurs fonctions sont donc de drainer les antigènes, d'optimiser et de réguler les interactions cellulaires indispensables à l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique et de distribuer dans les tissus appropriés les cellules effectrices.

Les organes lymphoïdes **primaires** sont chez les mammifères la **moelle osseuse**, siège de la lymphopoïèse et de la maturation des **lymphocytes B**, et le **thymus,** siège de la maturation des **lymphocytes T**. Chez les oiseaux il faut y ajouter un organe particulier, la **bourse de Fabricius**, au sein de laquelle s'accomplit la maturation de la lignée B et dont l'équivalent chez les mammifères serait la moelle osseuse. Les organes lymphoïdes **secondaires** sont les **ganglions lymphatiques**, la **rate**, les **tissus lymphoïdes associés aux muqueuses**.

La totalité de la population lymphocytaire est répartie dans un système immunitaire distribué dans tout l'organisme soit dans des entités anatomiques distinctes (les organes lymphoïdes) soit de manière diffuse dans les tissus ou dans des réseaux de circulation. Elle est composée d'environ $\mathbf{10^{18}}$ lymphocytes. Son poids global est d'environ **1,5 kg** pour un adulte de 70 kg, dont 70 grammes sont localisés dans la moelle osseuse.

Dans les capillaires artériels, qui sont les branches de division ultime des systèmes artériels de la circulation sanguine, avant le retour veineux, la pression artérielle est si élevée que, compte tenu de la faiblesse du diamètre, la totalité du flux circulatoire ne peut s'y écouler. L'excédent passe dans les tissus : 90 % revient immédiatement (dans les deux pulsations cardiaques qui suivent) dans la circulation sanguine au niveau des veinules. Les 10 % restant sont drainés par le système lymphatique.

Le **système lymphatique** débute par des capillaires lymphatiques borgnes qui se poursuivent par des vaisseaux de calibre de plus en plus gros qui se jettent finalement dans deux troncs principaux : le **tronc lymphatique droit**, qui draine la moitié **supérieure** du corps et qui se jette dans la **veine sous-clavière droite** ; le **canal thoracique** qui draine la moitié **inférieure** du corps et se jette dans la **veine sous-clavière gauche.**

Le volume du compartiment lymphatique est proche de celui du secteur sanguin (5 à 6 L chez l'adulte), mais le débit y est notoirement moindre (2 à 4 L/24h, contre 7000 L/24h pour la circulation sanguine. Cette lymphe, riche en cellules, est principalement le véhicule de lymphocytes (0,8 à $16x10^3/\mu L$)

Les organes lymphoïdes secondaires sont distribués sur le trajet des lymphatiques comme des stations de filtration pour y collecter les lymphocytes et y drainer les antigènes. Peu de territoires anatomiques sont dépourvus de lymphatiques : épiderme de la peau, oeil, système nerveux central, placenta, oreille interne, cartilage. D'autres, au contraire, sont très riches : derme, estomac, poumon, système génito-urinaire. Au cours de la phylogénèse le système lymphatique apparaît avec les premiers poissons cartilagineux.

II - ORGANES LYMPHOIDES CENTRAUX

Le système sanguin et lymphatique permet une circulation cellulaire intense et une répartition ubiquitaire des cellules immunocompétentes mettant à disposition de l'organisme, en permanence, la totalité du répertoire immunitaire.

Ce système est constitué de **cellules fixes** (cellules **stromales** ou **réticulaires**) et de **fibres** qui forment la trame des organes et des vaisseaux et de **cellules mobiles** (les cellules immunocompétentes : lymphocytes, cellules présentatrices de l'antigène [CPA]) formant le parenchyme des organes et responsable du traitement de l'information antigénique et de l'intervention à distance.

Les organes lymphoïdes **centraux** sont le site de **maturation** et de **différenciation** des lymphocytes. Le développement de ces derniers est totalement indépendant de la présence des antigènes et est sous le contrôle de l'activité inductrice du réticulum d'origine épithéliale. Ces organes sont le siège d'une intense activité mitotique favorisant les réarrangement géniques indispensables à la création des glycoprotéines de membrane reconnaissant spécifiquement l'antigène : les immunoglobulines de surface (sIgG) et le récepteur T de l'antigène (TCR). Seuls les lymphocytes porteurs de réarrangements fonctionnels émigreront hors de ces organes qui sont donc le lieu d'acquisition du **répertoire antigénique** mais aussi d'apprentissage de la **tolérance au soi.**

Les organes lymphoïdes centraux apparaissent tôt dans la vie embryonnaire, avant les organes lymphoïdes périphériques. Ils sont situés en dehors des voies de pénétration et de circulation des antigènes.

II-1-La moelle osseuse

*La moelle osseuse n'est pas qu'un organe lymphoïde puisqu'elle est le siège de l**'hématopoïèse** (production des cellules sanguines), et qu'on y retrouve toutes les lignées sanguines. Son importance est cependant fondamentale pour le système lymphoïde puisqu'elle produit les cellules précurseurs de toutes les populations lymphocytaires et des cellules phagocytaires. De plus chez les mammifères, elle est vraisemblablement le siège de la maturation et de la différenciation des lymphocytes B (cf infra). Chez un animal irradié à dose létale, seule la moelle osseuse est capable de reconstituer toutes les lignées sanguines, et en particulier de repeupler les organes lymphoïdes.*

*Pendant la vie foetale l'hématopoïèse débute dans le mésoderme intra-embryonnaire **(mésoderme caudal splanchno-pleural)** et intra-embryonnaire **(sac vitellin)**, où les précurseurs hématopoïétiques se regroupent en îlots. Elle se poursuit dans le **foie foetal**, et très transitoirement dans la rate. A la fin de la gestation la moelle osseuse prend le relais. L'hématopoïèse est exclusivement médullaire dès la 20ème semaine de gestation. La lignée lymphocytaire représente **10 à 20 %** des cellules médullaires.*

Au cours d'une maladie, appelée splénomégalie myéloïde, la rate et le foie peuvent retrouver, chez l'adulte, leur capacité hématopoïétique embryonnaire.

II-1-1- Architecture de la moelle

La moelle osseuse dérive du **mésenchyme**. Elle occupe l'espace libre à l'intérieur des os. On y distingue une moelle **rouge**, active, hématopoïétique, et une moelle **jaune**, inactive, graisseuse.

*Chez le nouveau-né toute la moelle osseuse est hématopoïétique. Chez l'adulte l'hématopoïèse est localisée à certains os: sternum, vertèbres, côtes, clavicule, bassin et crâne. Le volume de ce territoire, chez un adulte, est estimé à **5 litres.** Chez le vieillard, seuls les vertèbres et les os iliaques conservent leur potentialités hématopoïétiques.*

La vascularisation de la moelle débute par une artère nourricière qui se divise en deux artères centrales longitudinales dans la cavité centro-médullaire. Il en part des artères radiales qui se divisent en capillaires. Le retour veineux est successivement assuré par des sinus veineux, des veines radiales et des veines longitudinales.

Entre les vaisseaux et les travées osseuses la charpente réticulaire (cellules et fibres de collagène, de lamine, de fibronectine, d'hémopectine) forme une sorte d'éponge dont les pores sont remplis par le tissu hématopoïétique constitué des cellules hématopoïétiques, de cellules graisseuses et de macrophages. Selon les

*lignées les cellules hématopoïétiques se regroupent en **îlots** de localisation préférentielle: les érythrocytes et les mégacaryocytes sont proches des cellules réticulaires des sinus veineux; les granulocytes sont à distance des sinus veineux alors que les **lymphocytes** sont regroupés autour des **artères radiales**.*

Les éléments figurés matures quittent la moelle osseuse en franchissant l'endothélium des sinus veineux. Le passage dans la circulation sanguine est un phénomène actif.

II-1-2- Les cellules souches

Les **cellules souches hématopoïétiques** (**CSH**), qui ne sont à l'heure actuelle identifiables par aucun critère morphologique, se définissent par deux propriétés fonctionnelles fondamentales: leur **totipotence** et leur capacité d'**auto-renouvellement**. Elles se retrouvent dans la populations des **cellules CD34$^+$.**

Elles seules sont en effet capables de donner naissance à toutes les lignées sanguines, tout en gardant pour certaines la propriété de renouveler le compartiment des CSH nécessaires au maintien d'une hématopoïèse durable tout au long de la vie.

Les CSH sont estimées à 0,05 % des cellules médullaires. Elles sont dans la phase G0 du cycle cellulaire et ne répondent que peu ou pas aux cytokines inductrices connues (IL-1, -6, -3, GM-CSF, M-CSF et G-CSF).

*Seules les CSH sont capables de reconstituer l'hématopoïèse de souris irradiées à dose létale: à partir d'un faible nombre (20 à 40 CSH), en un à trois mois, on obtient par auto-renouvellement 20 000 CSH, et par différenciation de 1 à 3. 10^{19} lymphocytes par CSH. Ces CSH sont responsables de la formation de colonies dans les tissus hématopoïétiques, d'où le nom de "colony forming unit" (**CFU_S** et **CFU_t**; avec s pour "spleen" [rate] et t pour thymus).*

L'étape suivante de l'hématopoïèse est représentée par des **progéniteurs multipotents**, qui à la différence des CSH ne sont **plus doués d'auto-renouvellement** et ne sont plus capables de reconstituer l'hématopoïèse de souris irradiées à dose létale. En fonction des informations contenues dans le microenvironnement (cytokines, contacts cellulaires avec les cellules stromales) ces précurseurs vont s'engager irréversiblement dans une lignée. Pour les lymphocytes une partie poursuit son développement sur place: il s'agit de la **lignée B** qui aboutit au **plasmocyte** médullaire. Les précurseurs B et les lymphocytes pré-B représentent environ 20 % des cellules nucléées de la moelle osseuse et la majorité des lymphocytes de la moelle. Une autre partie migre vers l'autre organe lymphoïde primaire que constitue le thymus pour y devenir des lymphocytes T.

Ces précurseurs T portent des antigènes de surface (Thy-1, Ly 6-A) chez la souris qui sont accrochés à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un phosphatidylinositol et dont l'expression est impliquée dans le potentiel prolifératif. Ils disparaissent dès les stades précoces de différenciation et permettent d'identifier des progéniteurs de lignée restreints (PLR) à faible expression de Thy-1 sans expression de Ly 6-A.

Depuis 1988 un modèle de souris immunodéficientes (souris SCID pour "severe combined immunodeficiency") dépourvues de lymphocytes T et B (voir cours immunoglobulines IX-3-3-3) et greffées avec du tissu hématopoïétique humain permet une étude de la lymphopoïèse.

La moelle osseuse a donc , chez l'homme, **trois fonctions** dans la lymphopoïèse :

- elle agit comme organe **hématopoïétique** qui maintient constant le contingent des précurseurs des lymphocytes T et des lymphocytes B.
- elle est l'**organe lymphoïde primaire** pour la **lignée B**
- enfin elle héberge une partie des lymphocytes B activés par l'antigène en périphérie qui se transforment en **plasmocytes** secréteur d'anticorps.

II-2- La bourse de Fabricius

Chez les oiseaux les extrémités distales des tubes digestif et génito-urinaire fusionnent en une chambre commune appelée **cloaque**. L'anatomiste italien Fabricius (1537-1619) y a décrit une petite formation qui y est annexée, et porte désormais son nom, la **bourse de Fabricius**.

C'est le deuxième organe lymphoïde à apparaître au cours de l'ontogénèse, après le thymus. C'est en effet aux environs des 3ème-4ème jours qu'il se forme à partir d'une évagination de l'épithélium endodermique de la partie postérieure du cloaque. Aux 11ème-12ème jours se forment des follicules avec un cortex et une médullaire séparés par un épithélium. Dès les 8ème-9ème jours la bourse est colonisée par les cellules souches d'origine vitelline. D'épithéliaux, progressivement, les ***follicules*** *deviennent* ***lymphoïdes****.*

La bourse est un organe impair, médian, dont la muqueuse, la musculeuse et la séreuse sont en continuité avec celles de l'intestin. Son diamètre est d'environ trois centimètres. Son épithélium est cylindrique et ne contient pas de cellules à mucus. On retrouve des nodules lympho-épithéliaux dans la lamina propria avec une ***corticale*** *peuplée de petits lymphocytes, séparée, par une membrane basale et un épithélium, d'une* ***médullaire*** *comprenant des grands lymphocytes, des plasmocytes, des cellules épithéliales et des macrophages.*

La bourse de Fabricius subit une involution physiologique qui débute à l'apparition de la maturité sexuelle, soit sept à treize semaines après l'éclosion. Artificiellement, l'injection précoce de testostérone reproduit cette involution.

Chez les oiseaux la bourse de Fabricius est l'organe lymphoïde primaire de différenciation des lymphocytes B, dont l'équivalent chez les **mammifères** serait la **moelle osseuse**.

Les premières cellules à IgM de surface apparaissent vers le 11ème jour de la gestation. Les premiers lymphocytes B matures quittent la bourse de Fabricius à J18. A l'éclosion (J21) 90 à 95 % des cellules de la bourse sont IgM^+.

La **bursectomie néonatale** est responsable de la **disparition de l'immunité humorale** qui se traduit par une agammaglobulinémie, une absence de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires et une absence de plasmocytes. Par contre l'hypersensibilité retardée (type IV) et le rejet des allogreffes sont parfaitement conservées. Un tableau clinique équivalent est réalisé chez l'homme par un déficit immunitaire primitif : l'**agammaglobulinémie liée au sexe**, ou maladie de **Bruton,** du à un défaut d'une tyrosine kinase (Bruton tyrosine kinase ou Btk) qui provoque un blocage de la lignée B au stade de lymphocyte pré-B.

On distingue trois catégories de cellules souches en fonction de leur potentialité de différenciation :

- des ***cellules souches pré-bursiques*** *qui colonisent l'épithélium dès J8 lors de l'ontogénèse. On les retrouve dans la moelle osseuse d'embryons normaux traités par la testostérone qui détruit l'épithélium bursique. D'origine médullaire, elles seules sont capables de repeupler la bourse d'embryons de 12 jours irradiés. On a constaté que la colonisation d'un follicule se faisait par deux à sept cellules souches et qu'il n'y avait pas de trafic cellulaire d'un follicule à l'autre.*

- des ***cellules souches bursiques*** *dont l'existence est mise en évidence par l'action d'une drogue, le cyclophosphamide, dont l'injection à l'éclosion entraîne la destruction des lymphocytes bursiques en gardant intact l'épithélium. Des poulets ainsi traités peuvent être reconstitués par des greffes de cellules bursiques de poulets de deux semaines : il existe donc des cellules souches bursiques qui nécessitent le micro-environnement bursique pour leur complet développement. Environ 10 % des lymphocytes bursiques entrent en mitose par heure avec un temps de doublement de 7 à 10 heures. La production quotidienne de lymphocytes B est d'environ* 5×10^9 *soit la moitié du nombre de lymphocytes B totaux. Il y a donc, comme dans le thymus, une importante destruction qui semble le prix à payer pour l'obtention, au hasard et en l'absence de tout contact avec l'antigène, de la totalité du répertoire immunologique par la mécanique recombinatoire des gènes des immunoglobulines.*

*- des **cellules souches post-bursiques** dont l'existence est affirmée par les conséquences, différentes en fonction de la date, de la bursectomie. Après le 18ème jour de gestation la bursectomie n'entraîne plus d'agammaglobulinémie mais une absence de réponse anticorps à certains antigènes. La bursectomie post-natale n'entraîne qu'une suppression de la réponse IgG alors que la réponse IgM reste intacte. Un certain nombre de cellules quittent donc la bourse avant leur différenciation complète : ces cellules sont cependant incapables de reconstituer un poulet traité par le cyclophosphamide. Ce pool de cellules souches post-bursiques, $sIgM^+$, auto-renouvelables, servirait au maintien de la lignée B au cours de la vie adulte.*

II-3 LE THYMUS :

II-3-1 Mise en évidence du rôle du thymus

*Le rôle du thymus dans le développement des lymphocytes T a été démontré dès le début des années soixante sur la base d'arguments expérimentaux et d'observations cliniques. L'ablation du thymus ou **thymectomie** chez l'animal adulte n'a pas de retentissement considérable à courte ou à moyenne échéance, c'est la raison pour laquelle son rôle pendant longtemps a été méconnu.*

Chez la souris la **thymectomie néo-natale** entraîne un déficit immunitaire portant sélectivement sur les lymphocytes T. De même il existe une lignée de souris porteuse d'une mutation dite ***nude*** , caractérisée sur le plan phénotypique par une absence de pelage et une agénésie thymique, cause d'un déficit de l'immunité cellulaire par absence de lymphocytes T. Ses conséquences en sont : défaut de réponse cytotoxique, défaut d'hypersensibilité retardée, défaut de réponse anticorps aux antigènes thymo-dépendants, tolérance des allogreffes.

L'équivalent chez l'homme a été décrit sous le nom de **syndrome de DI GEORGE**, consécutif à une embryopathie qui touche les troisièmes et quatrièmes arcs branchiaux. La conséquence en est une agénésie thymique, une absence de glandes parathyroïdes entraînant une hypocalcémie et de fréquentes malformations des gros vaisseaux du coeur.

II-3-2- Anatomie

Le thymus est un organe bilobé situé dans la partie supérieure du médiastin antérieur. Il est assez volumineux à la naissance où il représente 1 % du poids du nouveau-né ; sa croissance propre est moins rapide que celle du reste de l'organisme. Le poids maximum est atteint chez l'adolescent puis on observe une involution très progressive. Chez le vieillard il ne reste plus que de vagues reliquats fibreux néanmoins fonctionnels.

Sa base repose sur le péricarde et son sommet affleure le manubrium sternal. Chaque lobe est divisé en multiples lobules par des septa fibreux qui sont issus de la capsule qui entoure l'organe.

Chaque lobule comprend une partie périphérique, le **cortex** plus sombre, et une partie interne plus claire, la **médullaire**.

Le thymus est un organe lymphoépithélial volumineux, d'environ une vingtaine de grammes chez l'adulte de 30 ans. Il est formé d'une trame de **cellules épithéliales** particulières, de forme étoilée avec de longues extensions cytoplasmiques jointives à leurs extrémités par des desmosomes, qui authentifient leur nature épithéliale. Leur cytoplasme contient des granulations de nature sécrétoire en rapport avec des médiateurs impliqués dans la maturation des lymphocytes T comme en témoigne la capacité des greffes de cellules épithéliales à restaurer la compétence immunitaires des souris thymectomisées à la naissance. Le parenchyme cellulaire qui comble ce réseau épithélial est fait de lymphocytes qui prennent le nom de **thymocytes**. Il est plus riche, et donc plus dense, dans le cortex que dans la médullaire. Dans cette dernière certaines cellules épithéliales se regroupent en structures arrondies, les **corpuscules de HASSALL**, dont la signification reste mystérieuse. A l'intérieur de ces corpuscules les cellules épithéliales peuvent se kératiniser, se calcifier ou se nécroser.

La vascularisation du thymus se fait à partir d'une artère thymique, branche de l'artère thoracique interne, et suit les septa conjonctifs avant de faire demi-tour et de remonter le long de la jonction

cortico-médullaire. De nombreux capillaires sont issus de ces artérioles et peuvent, pour un petit nombre, se jeter directement dans une veine interlobaire après avoir traversé la médullaire et, pour la majorité, s'être connectés avec les veinules post-capillaires après avoir traversé le cortex. La barrière sang-thymus est donc difficile à franchir car constituée de quatre épaisseurs: les cellules endothéliales, la membrane basale endothéliale, le tissu conjonctif périvasculaire et la membrane basale épithéliale. Elle est plus perméable dans la médullaire et au cours de la vie foetale.

Le thymus n'a **pas de lymphatiques afférents** mais possède de nombreux lymphatiques efférents à point de départ médullaire qui se drainent dans les ganglions du médiastin.

II-3-3- Ontogénie

Au cours de l'ontogénèse le thymus se développe, dès la 6ème semaine de gestattion, à partir des ***troisièmes et quatrièmes poches pharyngées*** *qui donnent également les ébauches des glandes parathyroïdes et de certains gros vaisseaux, ce qui explique les signes observés au cours du syndrome de DI GEORGE consécutif à une embryopathie touchant électivement ces arcs branchiaux. Dès les 9ème-10ème semaines de gestation les précurseurs hématopoïétiques qui sont issus du sac vitellin puis du foie foetal, sont attirés dans l'ébauche thymique, qui s'invagine, par des substances chimiotactiques sécrétées par les cellules épithéliales. Rapidement ces précurseurs s'engagent irrévocablement dans la lignée T. On ne sait pas si les précurseurs B sont incapables de franchir la barrière sang-thymus ou, dans l'hypothèse inverse, s'ils sont incapables de survivre une fois atteint le parenchyme thymique. Dès les 14ème-15ème semaines la séparation entre cortex et médullaire se fait jour et les premiers corpuscules de HASSALL sont observés vers la 16ème semaine, date à laquelle apparaîssent les premiers lymphocytes matures. La colonisation du thymus se fait par vagues entre lesquelles le thymus semble imperméable à la pénétration des précurseurs.*

Les **cellules épithéliales thymiques** dérivent de l'**ectoderme** pour celles du **cortex**, et de l'**endoderme** pour celles de la **médullaire**. Les cellules épithéliales produisent les cytokines indispensables au bon déroulement de la maturation des thymocytes : citons l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-3, l'IL-7 et le GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor).

Les autres cellules retrouvées dans le thymus sont toutes originaires de la moelle osseuse: **précurseurs des thymocytes**, **macrophages** et **cellules dendritiques** qui sont les deux types de CPA indispensables au bon déroulement de la différenciation thymique du lymphocyte T. La répartition de ces différentes cellules est fonction du site anatomique: le cortex est très riche en thymocytes les plus immatures et contient quelques macrophages alors que la médullaire est un peu moins riche en thymocytes et contient des macrophages en plus grand nombre ainsi que des cellules dendritiques. Les CPA et les cellules épithéliales expriment les antigènes du CMH.

Des expériences de greffes croisées entre lignées déficientes de souris ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental des cellules épithéliales thymiques dans la différenciation des lymphocytes T. Ces expériences ont été réalisées entre des souris scid *et des souris* nude*. Les premières ont une absence de recombinases qui bloque l'apparition de réarrangements tant des gènes des immunoglobulines que ceux du TCR: elles n'ont donc pas, entre autre, de précurseurs T, mais possèdent un thymus d'architecture de soutien normalement constitué de cellules épithéliales. A l'inverse le déficit des souris* nude *entraîne une agénésie thymique alors que les précurseurs T sont normalement présents. Une greffe de moelle de souris* nude *à une souris* scid *aboutit à un repeuplement du thymus normal des souris receveuses par les cellules greffées d'origine* nude*. Par ailleurs une greffe de thymus d'origine* scid *à une souris* nude *a pour conséquence une colonisation du thymus greffé par les précurseurs normaux de la souris receveuse. Les lymphocytes T des souris* nude *sont intrinsèquement normaux et capables de se différencier dans le bon microenvironnement.*

II-3-4 Organisation fonctionnelle

On estime qu'environ **1 à 2- 10^8** précurseurs lymphoïdes pénètrent quotidiennement dans le thymus alors que seulement **1-10^6** lymphocytes T matures en

ressortent, soit à peine 2 %. Le renouvellement quotidien porte donc sur environ 50 % des thymocytes qui pénètrent dans le thymus, soit 5-10^7 chez la souris. On voit donc qu'environ 98 % des thymocytes meurent dans le thymus par un phénomène d'**apoptose**, ou mort cellulaire programmée. Ces thymocytes condamnés à disparaître in situ sont ceux qui ne peuvent franchir avec succès les barrières successives de la **sélection positive** et de la **sélection négative** (voir cours "différenciation thymique").

Le **cortex externe, sous capsulaire**, contient de grandes cellules, les lymphoblastes, qui sont des cellules à division rapide. Ces thymocytes sont fonctionnellement immatures, représentent **5 à 15 %** de tous les thymocytes.

*Ils sont en contact étroit avec de grandes cellules épithéliales que l'on appelle cellules "nurses". Ils n'expriment pas de TCR ni de marqueurs de surface typique du phénotype mature. Ils se caractérisent par leur capacité à lier une lectine particulière, la peanut agglutinine **(PNA)** et leur forte expression d'une enzyme, la terminal deoxynucléotidyl transférase **(TdT)** responsable de la diversité de jonction observée lors des réarrangements géniques V-D et D-J par addition de nucléotides. Chez les rongeurs en raison de l'existence de récepteurs membranaires spécifiques des **corticoïdes** ces thymocytes sont particulièrement sensibles à l'action lympholytique des corticoïdes, et sont donc corticosensibles. L'absence de tels récepteurs sur les thymocytes corticaux de l'homme et des primates expliquent leur cortico-résistance. Ces thymocytes corticaux superficiels sont des **précurseurs immatures** doués de la propriété d'auto-renouvellement et de différenciation.*

Le **cortex profond** contient deux types de cellules : des **thymocytes** de taille moyenne, **corticosensibles** qui représentent **85 %** du total des thymocytes, et des **cellules épithéliales**.

*Ces thymocytes sont PNA^+ Tdt^+ . La capacité de lier la PNA est en corrélation inverse avec l'acquisition d'un acide sialique sur les glycoprotéines de membrane et, surtout, avec l'acquisition des récepteurs du "homing" (HR) (phénomène encore appelé écotaxie, cf infra) qui correspond à la propriété caractéristique des lymphocytes de migrer dans des tissus prédéterminés. Ces thymocytes interagissent avec les **cellules épithéliales**, qui expriment très fortement les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité **(CMH) de classe II**, par l'intermédiaire du TCR qu'elles commencent à synthétiser et exprimer. Une très forte proportion de ces thymocytes va mourir sur place (environ 90 %) correspondant en partie à des cellules ayant des réarrangements non fonctionnels du TCR.*

Dans la **médullaire** les thymocytes sont de taille moyenne, représentent **10 à 15 %** des thymocytes totaux et sont **corticorésistants** dans toutes les espèces.

*Ils expriment très fortement le **TCR**. Ils sont au contact de cellules épithéliales spatulées exprimant des antigènes de classe I du CMH et de cellules dendritiques interdigitées, dérivant de la moelle osseuse et exprimant les antigènes de classe I et de classe II du CMH. La médullaire intervient dans le processus de **sélection négative** par élimination des clones de thymocytes à TCR anti-soi de forte affinité.*

A la différence des autres organes lymphoïdes le thymus subit une **involution après la puberté**.

*Son poids relatif, par rapport à celui du corps est maximum à la naissance et son poids absolu décline après la puberté. Cette involution se traduit sur le plan anatomique par la diminution du nombre des thymocytes et l'augmentation des travées conjonctives. Cette involution est vraisemblablement sous contrôle hormonale puisque la castration, chez l'animal, la retarde et l'injection de corticoïdes l'accélère. Elle pose le problème de l'existence d'une éventuelle voie de **maturation extra-thymique** puisque la sélection et la différenciation des lymphocytes T se poursuit toute la vie.*

Le thymus est présent chez tous les vertébrés et un très faible pourcentage de cellules qui le quittent sont capables d'y revenir, contrairement aux idées reçues qui affirmaient qu'il n'y avait pas de retour possible vers les organes lymphoïdes primaires pour un lymphocyte périphérique qui y avait déjà accompli avec succès sa maturation fonctionnelle.

III - ORGANES LYMPHOIDES SECONDAIRES

Le développement de ces organes est phylogénétiquement et ontogéniquement **plus tardif** que celui des organes lymphoïdes primaires. Leur peuplement se fait à partir de cellules provenant de ces derniers. Ce sont des organes effecteurs : les lymphocytes y achèvent leur maturation et y expriment leurs capacités fonctionnelles sous l'influence des **stimulations antigéniques** qui remodèlent en permanence leur architecture.

Ils sont destinés à recevoir les lymphocytes T issus du thymus et les lymphocytes B issus de la moelle osseuse. C'est au niveau de ces organes périphériques que se feront les contacts avec les antigènes parvenant par la voie lymphatique ou la voie sanguine ou même à travers les épithéliums des muqueuses. Il faut noter d'emblée qu'il existe un **perpétuel remaniement** de ces structures et insister tout de suite sur le problème de la **recirculation** des lymphocytes qui sera explicité plus loin.

Les organes lymphoïdes secondaires sont répartis en deux sous-ensembles :

- un compartiment **systémique** dévolu à la protection immunitaire du milieu intérieur. Il comprend la rate, la majorité des ganglions lymphatiques et une partie du système lymphoïde diffus. Les isotypes prédominant y sont l'**IgG** et l'**IgM**.
- un compartiment **muqueux** destiné à la défense des muqueuses. Il comprend le tissu lymphoïde diffus des chorions muqueux, les ganglions lymphatiques qui les drainent, la glande mammaire. Il se singularise par la nature de l'isotype qui y prédomine : l'**IgA sécrétoire**.

Au cours de la phylogénèse les lymphocytes apparaissent chez les premiers vertébrés : les cellules quittent la circulation pour envahir les tissus de manière diffuse. La deuxième étape de l'évolution est marquée par l'apparition de follicules lymphoïdes qui facilitent les contacts entre les cellules. Puis ces follicules se regroupent en amas et finalement ces formations s'entourent de tissus spécialisés pour former les entités anatomiques individualisées sous le nom d'organes lymphoïdes. Cette évolution phylogénétique a été conservée au cours de l'ontogénèse : chez les mammifères on retrouve du tissu lymphoïde diffus, des follicules lymphoïdes solitaires et agrégés et des ganglions.

III-1 TISSUS LYMPHOÏDES DIFFUS

Toutes les surfaces de l'organisme sont recouvertes par un épithélium qui est formé d'une couche de cellules cubiques fermement liées entre elles par des desmosomes.

*En-dessous se situe la **lamina propria** constituée d'un réseau de fibroblastes et de fibres dont les mailles sont remplies par des cellules, dont des lymphocytes. Les lymphocytes sont également parsemés dans la couche sous-jacente qui se nomme la **sous-muqueuse**.*

III-2 LES FOLLICULES LYMPHOÏDES SOLITAIRES

Les follicules lymphoïdes sont des amas arrondis de lymphocytes et de cellules dendritiques, entourés par un réseau de capillaires lymphatiques et sans position anatomique fixe.

Ils sont localisés dans la **lamina propria,** et en plus pour ce qui est de l'intestin, dans la sous-muqueuse.

Leur morphologie varie en fonction de l'existence ou non d'une **stimulation antigénique**. On en distingue deux types :

- les follicules lymphoïdes **primaires** d'aspect uniforme observés en **l'absence de stimulation antigénique.**

Des animaux axéniques (encore appelés "germ-free"), c'est-à-dire élevés en ambiance stérile, ne possèdent que des follicules primaires.

- les follicules lymphoïdes **secondaires** à la structure polarisée caractérisée par la présence d'un **centre clair germinatif,** développé au sein de l'amas de petits lymphocytes du follicule primaire qu'il repousse en périphérie et qui y formeront le manteau. Le centre clair germinatif apparaît quelques jours après une **stimulation antigénique :** C'est une zone **burso-dépendante**.

C'est un site de prolifération lymphocytaire clonale comme en témoignent l'abondance des mitoses et la basophilie du cytoplasme secondaire à la présence de grande quantité d'ARN messager. C'est une zone peu sensible aux effets de la thymectomie mais totalement assujettie à la présence de la bourse de FABRICIUS, chez les oiseaux, pour son plein développement. Après bursectomie on n'observe plus que des follicules primaires. On y distingue deux zones : une zone claire elle-même divisée en zones apicale et basale constituée de lymphoblastes B à intense activité mitotique et de différenciation. Les macrophages qui s'y trouvent possèdent dans leur cytoplasme des corps tingibles qui sont des débris cellulaires d'immunoblastes phagocytés. La dernière zone est dite sombre et est constituée de lymphocytes B de moyenne et grande taille, de macrophages.

Le follicule lymphoïde est constitué de deux types cellulaires : les cellules lymphoïdes et les cellules non-lymphoïdes. Ces dernières sont représentées par un réseau de **cellules folliculaires dendritiques (CFD)** dont la fonction est de capter les antigènes soubles complexés aux anticorps et de les exposer de façon durable à leur surface grâce à l'expression de récepteur pour le fragment Fc des Ig (RFc).

III-3 LES GANGLIONS LYMPHATIQUES

III-3-1- Architecture du ganglion lymphatique

Les ganglions lymphatiques sont des organes **encapsulés** qui sont situés sur le réseau lymphoïde. Ils sont situés aux régions **carrefour** (aisselle, aisne, base du cou, etc...).

Leur taille varie de la grosseur d'une tête d'épingle à celle d'une noisette. Leur origine est mésenchymateuse et ils sont infiltrés de lymphocytes dès la 11ème-12ème semaine de gestation. Ils sont constitués d'agrégats organisés de lymphocytes et de cellules présentatrices d'antigène. Ils drainent, aux points stratégiques, toutes les voies de pénétration des antigènes exogènes.

Les ganglions sont des organes en forme de haricot assimilables à des **filtres** interposés sur la circulation lymphatique. Ils ont une double fonction :

- **exclusion des pathogènes** par phagocytose des macrophages
- **initiation** de la **réponse immunitaire adaptative**

*Très petits, minuscules à la naissance, ils augmentent rapidement de volume en fonction des sollicitations antigéniques environnantes. Ils sont entourés par une **capsule conjonctive** qui envoie des septa ou trabécules à l'intérieur de l'organe. Leur capsule est perforée par des vaisseaux lymphatiques afférents, valvulés, issus des ganglions d'amont. Au niveau du **hile** on distingue les vaisseaux lymphatiques efférents destinés aux ganglions d'aval, une ou plusieurs artérioles nourricières et un système veineux de sortie. Sous la capsule existe un espace virtuel, le sinus marginal, dilaté lors d'un flux lymphatique trop important, de la sorte la lymphe "excédentaire" circulera dans cet espace sous-capsulaire et se dirigera immédiatement vers le lymphatique efférent et le ganglion sus-jacent sans même avoir le temps de percoler à travers le ganglion proprement dit.*

Le **parenchyme ganglionnaire** est séparé en trois sous-régions :

- une région périphérique sous-capsulaire plus ou moins épaisse : le **cortex**,
- la région la plus profonde, proche du hile et donc de la sortie du ganglion : la **médullaire**,

- enfin, entre les deux précédentes la région dite corticale profonde ou **paracorticale**.

Les régions **corticale** et **médullaire** sont surtout riches en **lymphocytes B** alors que la région **paracorticale** est à **prédominance T**. On trouve des macrophages dans toutes les zones.

La vascularisation sanguine du ganglion se fait par une artère qui pénètre dans le parenchyme au niveau du hile dont les divisions ultimes capillaires se font avant la jonction cortico-médullaire. Dans cette zone paracorticale les **veinules post-capillaires** qui leur font suite se caractérisent par des **cellules endothéliales** de morphologie particulière **cuboïdale**, turgescentes (**HEV** pour "high endothelial venules"). C'est à leur niveau que se fait le passage des lymphocytes du sang vers le parenchyme ganglionnaire par un mécanisme actif appelé **diapédèse**.

Sur le plan architectural on décrit :

- un **sinus marginal**, sous-capsulaire, baigné par la lymphe dans laquelle circulent les CPA et les lymphocytes.

Les lymphatiques afférents se jettent dans un sinus marginal sous-capsulaire dont le revêtement endothélial est en continuité avec celui des vaisseaux lymphatiques. Ces derniers sont munis de valves anti-reflux pour lutter contre la force de la pesanteur, mais ne possèdent pas, à la différence des vaisseaux sanguins, de paroi musculaire organisée : la contraction des masses musculaires est donc indispensable à la progression de la lymphe. A partir du sinus marginal la lymphe chemine dans des sinus qui suivent les septa pour aboutir aux sinus médullaires puis aux lymphatiques efférents qui sortent du ganglion au niveau du hile. Dans les sinus le ralentissement du débit permet le passage des lymphocytes de la lymphe vers le parenchyme ganglionnaire.

- un **cortex**, ou zone corticale, partie la plus externe du ganglion, qui contient essentiellement des **lymphocytes B**.

*Ces cellules sont regroupées en **follicules**, que l'on appelle **primaires** en l'absence de toute stimulation antigénique. Leur architecture est homogène. Après une stimulation antigénique il constitue un **follicule secondaire**, un **centre clair germinatif** s'individualise, correspondant à une de prolifération rapide des lymphocytes B, qui sont accompagnés de quelques cellules folliculaires dendritiques et de quelques lymphocytes T ($CD4^+$).*

- une **zone paracorticale**, qui contient principalement des **lymphocytes T** ainsi que des **cellules interdigitées** (nom local des cellules dendritiques, voir cours "cellules de l'immunité") qui expriment fortement les antigènes HLA de classe II et dont la fonction est de présenter l'antigène aux lymphocytes T. cette zone est le site **d'induction des réponses cellulaires T**

*Cette région riche en lymphocytes T a pour particularité de présenter une boucle capillaire artério-veineuse tout à fait spéciale. En effet, la veinule de cette boucle possède un revêtement de cellules cubiques hautes, épaisses, cette structure est nommée **veinule post-capillaire** (VPC). Ces cellules sont traversées en permanence par des lymphocytes spécialement des lymphocytes T, qui quittant le courant circulatoire veineux sont retrouvés après traversée de cette cellule épithéliale dans le parenchyme ganglionnaire proprement dit. Là ils séjourneront un moment avant de reconnaître l'éventuel antigène pour lequel ils sont prédestinés, et alors s'activer, se diviser, quitter le ganglion par la voie lymphatique efférente, remonter de proche en proche jusqu'au canal thoracique, se déverser dans la circulation veineuse générale, puis par le biais de l'oreillette gauche, du ventricule gauche être propulsés à nouveau dans toute la circulation artérielle donc vers d'autres veinules post-capillaires. Ceci explique la dissémination de l'information et de la mémoire immunitaire. Des lymphocytes activés grâce à la présence de l'antigène dans un ganglion quelconque peuvent très bien être retrouvés du moins par le biais de leurs descendants dans une autre région du corps après un espace de temps variable.*

- la **zone médullaire** est riche en **lymphocytes B**, mais surtout en **plasmocytes**, cellules destinées à la fabrication des anticorps situés dans les cordons médullaires. Il existe également de nombreux macrophages.

Il est prouvé que la synthèse des anticorps démarre au niveau des follicules lymphoïdes secondaires, mais elle ne va pas jusqu'à son terme dans cette région, il faut que des immunoblastes B se déplacent, traversent la corticale profonde pour se localiser dans la médullaire, devenir des plasmocytes, véritables usines à anticorps dont la sécrétion sera déversée dans la région du hile et sortira par les lymphatiques efférents.

Les vaisseaux lymphatiques afférents déversent dans le sinus marginal les lymphocytes et les CPA des territoires qu'ils drainent. Les lymphocytes sanguins pénètrent dans le parenchyme ganglionnaire au niveau de l'endothélium spécialisé des veinules post-capillaires, grâce à des interactions séquentielles et spécifiques entre des adressines endothéliales et des sélectines et intégrines lymphocytaires (cf infra). Les lymphocytes ressortent du ganglion par le lymphatique efférent.

Les fonctions du ganglion sont de **capter**, de **retenir**, de **phagocyter** des particules étrangères inorganiques (poussières) des particules étrangères organiques (antigène), des agents infectieux (micro-organismes) et des cellules atypiques (métastases). L'absence de membrane basale favorise les échanges entre les vaisseaux et le parenchyme. La proximité des cellules qui y résident favorise les contacts nécessaires à l'élaboration d'une réponse immunitaire spécifique.

III-3-2- Le centre clair germinatif du ganglion

Les lymphocytes B activés prolifèrent intensément dans le microenvironnemnt spécialisé du **centre clair germinatif** du ganglion. On y décrit une zone **sombre** et une zone **claire**, entourées d'un **manteau** (voir cours "lymphocyte B")

*Il est impossible de reproduire in vitro, par simple co-culture de lymphocytes T et B, la **maturation d'affinité** des anticorps observée au cours d'une réponse immunitaire in vivo. Celle-ci nécessite le microenvironnement ganglionnaire.*

*Après pénétration dans le parenchyme ganglionnaire le lymphocyte B, stimulé par le lymphocyte T dans la zone para-corticale, peut soit participer à la production immédiate d'IgM, soit migrer vers le follicule primaire. Là, par contact avec les **cellules folliculaires dendritiques**, il va subir une intense **prolifération clonale** ainsi qu'une **maturation d'affinité** de sa sIg. Les cellules folliculaires dendritiques ont une origine différentes des cellules dendritiques du thymus avec qui elles n'ont en commun que la forme étoilée, due à leurs ramifications ou dendrites. Elles sont capables de garder longtemps à leur surface les antigènes, sous forme de complexes immuns, grâce à différents types de récepteurs (du complément, pour le Fc des immunoglobulines), et ainsi de les présenter. Elles expriment aussi à leur surface la molécule **CD23** qui se lie au CD21 (ou récepteur CR2 du complément) du complexe CD21-CD19-TAPA-1 retrouvé à la membrane du lymphocyte B (voir cours spécifique lymphocyte B).*

Chez un individu préalablement immunisé et possédant des anticorps circulants la stimulation antigénique conduit à la formation de complexes antigène-anticorps qui sont fortement liés à la surface des CFD et y persistent longtemps sans être dégradés, stimulant ainsi les lymphocytes B mémoire circulants.

L'anatomie du ganglion n'est donc pas fixe et dépend de la stimulation antigénique. La prolifération lymphocytaire et les centres germinatifs régressent après élimination du stimulus antigénique.

III-4 La rate

III-4-1 Ontogénie

La rate est **le plus gros organe lymphoïde** chez l'homme (150 grammes) et est située dans le **quadran supérieur gauche** de l'abdomen, derrière l'estomac. A la différence

des autres organes lymphoïdes secondaires c'est un filtre placé sur la circulation sanguine et non lymphatique : elle n'a **pas de lymphatiques afférents** et assure ainsi l'épuration des antigènes véhiculés par le sang.

*Durant l'ontogénèse son ébauche, d'origine **mésenchymateuse**, apparaît dès la **5ème semaine de gestation**. Ultérieurement les lymphocytes colonisent la trame vasculaire et réticulaire.*

*La rate est un organe qui peut être considéré d'un certain point de vue comme le plus gros ganglion mais on lui connaît aussi un rôle **hématologique** important qui complique un peu la description anatomo-histologique. En effet au cours de la **vie foetale**, la rate a une fonction **hématopoïétique** au même titre que le foie foetal. Elle conserve ensuite chez **l'adulte** la fonction de **"cimetière"** des globules rouges ; ceux-ci en effet après une durée de vie bien déterminée sont détruits par les macrophages de la rate ainsi que du foie. On connaît d'ailleurs la splénomégalie des anémies hémolytiques avec destruction exagérée des globules rouges.*

Il faut noter que la rate ne comporte **pas de circulation lymphatique.**

III-4-2 Anatomie

*Son architecture s'organise autour du réseau vasculaire. L'**artère splénique** pénètre dans l'organe au niveau du hile et ses branches de division suivent les septa conjonctifs qui sont issus de la capsule qui entoure la rate.*

*Les petites artérioles sont entourées d'un manchon lymphoïde périartériolaire, constitué de petits lymphocytes, auquel sont annexés des **follicules lymphoïdes** primaires ou secondaires appelés **follicules de MALPIGHI**. On dénombre 10 à 20 000 follicules dans une rate d'un adulte sain. L'ensemble manchons lymphoïdes et follicules constitue la **pulpe blanche** de la rate. Au niveau de la zone marginale les artérioles, appelées pénicillées, perdent leur manchon lymphoïde. Elles prennent fin en se jetant dans des sinus veineux ou directement dans le parenchyme qui constitue un réseau de cordons cellulaires appelés **cordons de BILLROTH**. L'ensemble cordons cellulaires et sinus veineux forme la **pulpe rouge** de la rate en raison de l'abondance des hématies. Le sang veineux est drainé jusqu'à la veine splénique qui sort au hile et rejoint la circulation portale.*

Les lymphocytes et les CPA sont compartimentalisés dans la rate comme dans le ganglion. Les manchons lymphoïdes péri-artériolaires sont une **zone T dépendante** : les lymphocytes T qui s'y trouvent sont pour 2/3 $CD4^+$, 1/3 $CD8^+$., avec cependant une plus forte représentation des lymphocytes Tγδ (20 %) que dans la circulation sanguine Les **follicules de MALPIGHI** représentent des territoires **burso-dépendants** aux structures anatomiques et aux fonctions identiques à celles précédemment décrites pour les follicules lymphoïdes isolés et le ganglion. La zone marginale reçoit la majeure partie du flux sanguin et on y retrouve de nombreux macrophages qui y exercent leur pouvoir phagocytaire. Les **cordons de BILLROTH** sont une zone **burso-dépendante** constituée d'une trame réticulinique avec des cellules fixes, les CPA, et des cellules mobiles, les éléments figurés du sang dont des lymphocytes et des plasmocytes qui proviennent de cellules différenciées dans la pulpe blanche. C'est le lieu d'une synthèse active d'anticorps.

La fonction de la rate est double. C'est un lieu de **production d'anticorps** et de **cellules immunocompétentes** vis-à-vis d'antigènes arrivant par **voie sanguine**. Deuxièmement elle joue un rôle de **filtre** important placé sur la circulation sanguine pour y éliminer, grâce à ses macrophages, les particules étrangères et les éléments figurés sénescents, principalement les globules rouges. Son architecture est fonction de l'état immunitaire de l'individu : chez un adulte normal la **pulpe blanche** ne représente que **20 %** du parenchyme splénique.

Après une intense stimulation antigénique ce chiffre peut dépasser 50 %. Son rôle dans la défense anti-infectieuse est particulièrement illustrée par la fréquence de survenue des septicémies chez des sujets splénectomisés.

III-5 LES FORMATIONS LYMPHOÏDES ANNEXÉES AUX MUQUEUSES

Les muqueuses représentent une importante aire de contact avec l'environnement, estimée à **500 m^2**.

*Au niveau digestif cette surface comporte 7 couches. De la lumière tissulaire vers l'intérieur on distingue : un **épithélium**, la **lamina propria** ou **chorion**, une **musculaire muqueuse**. Ces 3 couches constituent la membrane muqueuse qui forme des **villosités** dont le nombre diminue du duodénum à l'iléon terminal. Ensuite on retrouve une **sous-muqueuse**, une **musculeuse** avec une couche de fibres musculaires circulaires et une longitudinale et enfin une **séreuse**.*

La muqueuse est infiltrée par de nombreux lymphocytes et plasmocytes, principalement à **IgA** qui se présentent soit de manière diffuse, soit sous forme de follicules isolés soit enfin, en certains sites anatomiques, sous forme d'agrégats de follicules lymphoïdes. Ces sites privilégiés sont les amygdales, les **plaques de PEYER** (PP) du nom de l'anatomiste suisse (1653-1712) qui les a décrites au niveau de l'iléon terminal et l'**appendice iléo-coecale**. Ils se caractérisent par l'**absence de lymphatiques afférents**, les antigènes provenant directement de la lumière intestinale.

Le système immunitaire muqueux diffère du système immunitaire systémique par la nature de l'isotype prédominant d'immunoglobuline (**IgA**) à la structure particulière (**IgA sécrétoire)** et par la caractéristique fondamentale de ces cellules de recirculer après l'immunisation primaire pour venir coloniser spécifiquement des territoires du même compartiment muqueux (phénomène d'**écotaxie**, ou "**homing**").

*Ces tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (en anglo saxon = **MALT** pour "mucosal-associated lymphoïd tissues") comprennent ceux du tissu digestif (**GALT** pour "gut-associated lymphoïd tissues"), du tractus respiratoire (**BALT** pour "bronchial-associated lymphoïd tissues") et du système glandulaire (**DALT** pour "duct-associated lymphoïd tissues"). Ils sont impliqués dans l'absorption, l'apprêtement (ou "processing") et le transport des antigènes exogènes alimentaires ou respiratoires.*

La production journalière d'IgA excède celle de toutes les autres classes réunies, comme en témoigne le tableau ci-dessous:

IgA : 70 mg/kg/jour
IgG : 30 mg/kg/jour
IgM : 8 mg/kg/jour
IgD : 0,4 mg/kg/jour
IgE : 0,02 mg/kg/jour

*En effet un mètre d'intestin contient environ 10^{10} cellules productrices d'immunoglobulines alors que l'ensemble des organes du compartiment systémique (moelle osseuse, rate, ganglions périphériques) n'en contient que 2,5 x 10^{10}. Il a été calculé que cette synthèse locale aboutit à la production de **0,78 g/jour** d'IgA pour un mètre d'intestin.*

III - 5 - 1 - Les amygdales

Elles sont placées à l'entrée des voies aéro-digestives supérieures comme six sentinelles.

*On en individualise deux palatines de chaque côté du pharynx, une linguale, une pharyngée et deux tubaires situées à l'orifice de la trompe d'Eustache. L'ensemble forme l'**anneau de WALDEYER**. Des cryptes très prononcées sont retrouvées à la base des villosités des deux amygdales palatines. Les produits de sécrétion y stagnent facilement, devenant ainsi d'excellents milieux de culture et favorisant ainsi la pullulation microbienne et les infections fréquentes.*

On a tendance actuellement à limiter les indications de l'amygdalectomie chez les enfants à des infections répétées sévères avec angines ou phlegmons et d'être beaucoup moins systématique qu'on ne l'a été il y a une vingtaine d'années.

III - 5 - 2 - Les plaques de PEYER

Quelle que soit l'espèce les PP représentent un constituant majeur du tissu lymphoïde intestinal. Chez l'homme on en dénombre environ 240 à la puberté, chiffre qui décline avec l'âge. Ce sont les **sites inducteurs** de la réponse immunitaire muqueuse.

Elles comportent un épithélium caractéristique associant des cellules épithéliales cubiques, des cellules caliciformes et des **cellules M** ou cellules épithéliales associées aux follicules qui sont capables de capter sans les dégrader les antigènes et qui présentent des associations étroites avec les cellules dendritiques, responsables de la présentation de l'antigène aux lymphocytes. Cet épithélium recouvre un dôme où l'on retrouve des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules présentant l'antigène. En-dessous se situent des follicules lymphoïdes avec des centres germinatifs, siège des lymphocytes B, et des zones parafolliculaires, T dépendantes.

Les précurseurs d'origine médullaire (lymphocyte B) et thymique (lymphocyte T) arrivent par voie sanguine et pénètrent dans les follicules au niveau des veinules post-capillaires par interaction avec des cellules endothéliales de morphologie particulière (HEV pour "high endothelial venules", cf. infra).

Leur principale caractéristique est d'être enrichies en précurseurs de lymphocytes B sécréteurs d'IgA. Cependant malgré la présence de toutes les sous-populations lymphocytaires requises, il n'y a pas de production locale d'IgA.

Après stimulation par l'antigène les cellules prolifèrent et migrent vers les ganglions mésentériques où la prolifération clonale se poursuit et où survient la maturation en plasmoblastes à IgA intra-cytoplasmiques ; puis, par le canal thoracique, elles gagnent le compartiment vasculaire ; elles sont capables alors de revenir, après différenciation, dans le compartiment muqueux (phénomène d'écotaxie ou "homing") où elles seront responsables de la synthèse d'IgA. Ceci a été démontré chez l'animal et chez l'homme. Ces cellules différenciées ne recirculent pas et ont une durée de vie de 5 à 6 jours. Il se pourrait même que certains de ces lymphocytes B mémoires, "primés" dans les PP, puissent migrer dans la moelle osseuse et y être responsables d'une partie de la réponse IgA. C'est ce que suggèrent certains modèles expérimentaux chez la souris.

Les PP sont très peu développées à la naissance ; elles sont colonisées dès la première semaine de vie intra-utérine par les lymphocytes T plus tardivement par les lymphocytes B. Leur développement est sous la dépendance de la flore microbienne puisque l'on n'observe pas de centres germinatifs chez les animaux élevés en condition axénique.

III - 5 - 3 - L'appendice iléo-caecale

L'appendice iléo-caecale est une formation de 10 à 15 cm de long annexée à la jonction iléo-caecale ayant la structure en 7 couches de la paroi digestive mais ne possédant pas de villosités. Son chorion est infiltré par de nombreux (environ 200) follicules lymphoïdes ce qui lui confère une structure proche de celle des amygdales.

III- 5 - 4 - Le système immunitaire cutané :

La peau est en effet riche en lymphocytes et en **cellules de LANGHERANS** (nom local des cellues dendritiques, voir cours spécifique).

III - 5 - 5 - Les séreuses :

On trouve au niveau des séreuses (plèvre, péricarde, péritoine) un faible pourcentage d'une sous-population particulière de lymphocytes B, dite **B1**, identifiée par le marqueur **CD5** (voir cours lymphocyte B).

III - 5 - 6 - Les sites effecteurs : lamina propria et lymphocytes intra-épithéliaux

La **lamina propria** est peuplée de cellules immunocompétentes complètement différenciées, à pouvoir effecteur distinct. C'est le siège différenciation terminale des lymphocytes issus des plaques de Peyer.

On y retrouve 20 à 40 % de plasmocytes, principalement secréteurs d'IgA, 40 à 60 % de lymphocytes T CD4$^+$ et CD8$^+$, cellules cytotoxiques diverses (lymphocytes T cytotoxiques ou CTL, cellules LAK ou "lymphokine activated killer cells" de phénotype CD8$^+$ CD16$^-$ NK$^-$H1$^-$, cellules NK ou "natural killer" de phénotype NK$^-$H1$^+$, CD16$^-$), 10 % de macrophages, 5 % d'éosinophiles et au moins deux populations différentes de mastocytes selon le contenu des granules (protéinases, protéoglycans).

On retrouve au sein de l'épithélium muqueux des lymphocytes, les **LIE** (**Lymphocytes intra-épithéliaux**) : ce ne sont jamais des lymphocytes B mais des **lymphocytes T** ayant une morphologie typique de grand lymphocyte granuleux (LGL pour "large granular lymphocyte").

Ces granulations contiennent de la chondroïtine sulfate, du granzyme, de la perforine. Chez la souris 95 % de ces LIE sont des lymphocytes T qui se répartissent, selon l'origine, en deux sous-populations différentes:

*- l'une est **thymodépendante** et compte pour 33 % de lymphocytes T CD8$^+$ à structure d'hétérodimère* 99, *CD5$^+$ Thy1$^+$ CD45$^+$ et de 10 % de lymphocyte T CD4$^+$. Ces lymphocytes ont subi une sélection négative thymique avec élimination des clones potentiellement auto-réactifs, utilisant des V*9 *du TCR particuliers (V*98-1, *V*96 *et V*911*). Les précurseurs T post-thymiques subissent une stimulation antigénique au sein des PP et suivent le même circuit d'écotaxie que les lymphocytes B sIgA qui les ramène au sein de l'épithélium. Chez les animaux axéniques, ou chez les souris nudes, cette population LIE T-dépendante est absente.*

*- la deuxième population est **thymo-indépendante** et existe chez les souris nudes. Elle compte pour 57 % des LIE et présente le phénotype CD8$^+$ à structure homodimère* 99 *CD5$^-$ Thy1$^+$ ou 1$^-$ ou CD4$^-$ CD8$^-$. Ces lymphocytes T-indépendants ne semblent pas subir de délétion des V*9 *associés aux réactions auto-immunes, ce qui ne prêterait pas à conséquence puisqu'ils ne sont pas destinés à être exportés, n'exprimant pas d'autres recepteurs du homing que ceux spécifiques du tube digestif.*

L'épithélium intestinal semble donc capable d'attirer des précurseurs T médullaires qui ont donc la capacité de se différencier et d'acquérir leur spécificité au contact d'antigènes présentés par l'épithélium. Contrairement à leurs homologues à maturation thymique ils ne subissent ni sélection négative (délétion de clones auto-réactifs) ni sélection positive (sélection des lymphocytes T CD4$^+$ par les antigènes de classe II du CMH, sélection des CD8$^+$ par les antigènes de classe I).

Ils sont capables de secréter diverses lymphokines après stimulation par les antigènes ou les mitogènes des parois de microorganismes et sont doués d'activité **cytotoxique**. Par le biais de la sécrétion d'interferon1 (IFN1) ils peuvent aussi induire l'expression d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sur les cellules épithéliales coliques qui normalement ne les expriment pas, ce qui pourrait avoir une importance en pathologie.

*Ces LIE possèdent un récepteur T spécifique de l'antigène (TCR). Comme dans le sang périphérique le pourcentage de lymphocytes T porteurs d'un TCR*11 *est faible (environ 2 %) mais contrairement à ces derniers, qui sont marqués par une prédominance d'hétérodimères liés de manière covalente par un pont disulfure (donc* 1_I1*), au sein des LIE ce sont ceux présentant des TCR*121 *(non liés) qui prédominent, sans que l'on ait à ce jour trouvé d'explication à ce phénomène (avantage vis-à-vis des antigènes intestinaux ?). De plus à la différence des lymphocytes T sanguins périphériques à TCR*11*, qui sont double négatifs CD4$^-$ CD8$^-$, les LIE à*

*TCR*11 *sont en majorité CD8*$^{+}$99 *CD4*$^{-}$. *La plupart de ces LIE expriment, en outre, une intégrine particulière,* 9_E9_7, *dont le ligand est inconnu. L'origine des LIE est variable selon les espèces: chez le poulet la majorité des précurseurs sont thymiques.*

A la différence des entérocytes coliques qui ne les expriment qu'après activation lors d'un processus inflammatoire, les entérocytes de l'intestin grêle, tout comme les cellules épithéliales thymiques, expriment de manière constitutive les antigènes HLA de classe II. Ils peuvent donc se comporter comme des APC pour les LIE CD4+ et participer à la mise en place du phénomène de tolérance orale vis-à-vis des antigènes alimentaires (cf infra). En effet le milieu intestinal du grêle se caractérise par une très grande richesse et diversité en antigènes alimentaires contrastant avec une faible population bactérienne, alors que l'inverse est vrai dans le colon où les LIE sont moins nombreux.

Les fonctions de ces LIE sont donc multiples :
- **cytotoxique** par leurs granulations ; secrétrice (IL-2, IL-3, IFN1, TNF9)
- **écotaxique**

il existe une intégrine avec une chaîne 9 *propre au compartiment muqueux,* $9E9_7$ *qui n'interviendrait pas dans le homing, mais plutôt dans le maintien des LIE dans l'épithélium: en effet son expression est induite une fois les LIE dans l'épithélium, sous l'effet de certaines cytokines comme le TGF*9, *et des anticorps anti-*$9E9_7$ *n'inhibent pas le homing) ;*

- **reconnaissance de l'antigène** de manière classique par fixation de l'antigène dans la poche polymorphique de l'antigène du CMH ou par reconnaissance d'un super-antigène lié à la portion latérale non polymorphique de l'antigène du CMH et reconnu par la partie latérale de la chaîne 9 ou 1 du TCR. Les entérotoxines ou les protéines de stress sont des exemples de super antigènes.

Les LIE thymoindépendants se différencient dans le micro-environnement intestinal: les antigènes HLA de classe I non classiques (Tl, Qa), peu polymorphes, sont fortement exprimés sur les cellules épithéliales et serviraient à la présentation des antigènes, expliquant le caractère oligoclonal de leur répertoire. Au cours de l'ontogénèse on a détecté des réarrangements du gène de la chaîne 1 *du TCR dans les LIE avant le développement thymique, ce qui suggère que ce circuit de différenciation extra-thymique est antérieur au cours de l'ontogénèse, et peut-être de la phylogénèse, ce qui aurait une importance dans le développement de la tolérance orale (cf infra) et de la colonisation bactérienne.*

L'activation des LIE se feraient principalement de manière non-spécifique de l'antigène, par la voie d'activation CD2, les entérocytes exprimant le ligand CD58 ou LFA-3 (cf infra), en utilisant des molécules accessoires propres 9_E9_7, *et non les* 9_1 *intégrines, et des molécules HLA de classe I non classiques. En effet dans la maladie coeliaque où l'antigène est connu (gliadine, cf infra) on est incapable d'isoler des LIE spécifiques de la gliadine.*

Les LIE sont donc capables, par cytotoxicité, de détruire des cellules épithéliales infestées (par un virus) ou recouvertes de toxines bactériennes ou à la teneur augmentée en protéines de stress. L'atrophie villositaire n'apparaît que lorsque la cicatrisation par renouvellement rapide de l'épithélium ne compense plus la destruction.

On distinguerait ainsi un premier front, les LIE responsables d'une réponse immédiate supplée par une base arrière, la lamina propria capable de fournir différents types de réponses immunitaires selon le stimulus.

IV- L'ÉCOTAXIE ("OU "HOMING")

IV-1 DESCRIPTION

IV-1-1 La recirculation

La recirculation des lymphocytes est un élément capital qui permet d'augmenter la probabilité de rencontre entre un clone de lymphocytes et son antigène spécifique. Cette recirculation pallie à l'impossibilité qu'a l'organisme d'exprimer en tout site et à n'importe quel moment l'intégralité du répertoire immunologique. La compartimentalisation du système immunitaire en organes lymphoïdes primaires, secondaires permet de

répondre avec le moindre coût aux impératifs requis pour l'élimination de l'antigène. On a ainsi pu calculer que chez le rat 4. 10^7 lymphocytes par heure regagnent le compartiment sanguin via le canal thoracique, ce qui représente un renouvellement de 10 à 20 fois par jour du pool total des lymphocytes sanguins. Le plus souvent ce sont les mêmes lymphocytes qui recirculent avec, en plus à chaque cycle, quelques lymphoblastes ou quelques cellules effectrices nouvelles.

Chez l'homme on estime qu'il existe environ $10.^{12}$ lymphocytes représentant 10^8 à 10^{10} clones différents. Des travaux classiques et anciens estiment que le **renouvellement quotidien** porte sur **20 %** du total de ces lymphocytes. Ce phénomène actif, de recirculation dépend de phénomènes d'**adhérence** entre les différents types cellulaires qui sont finement régulés.

Il fait intervenir des interactions spécifiques entre des récepteurs de "homing" (de domiciliation) sur les lymphocytes et des adressines (molécules d'adressage) sur les cellules endothéliales. C'est le même panel de molécules qui est utilisé par les polynucléaires (voir cours spécifique).

Pour comprendre ce traffic lymphocytaire, il faut s'imaginer son fonctionnement comme celui de la Poste, avec le lymphocyte dans le rôle de la lettre avec son code postal ("homing"récepteur) et la cellule endothéliale dans celui de la rue, avec son adresse (adressine).

En effet il n'existe pas en principe dans la circulation sanguine d'adhérence homotypique ou hétérotypique entre les cellules et les interactions avec les cellules endothéliales sont circonscrites à des territoires particulièrement focalisés. Cette recirculation est contrôlée par 3 mécanismes : l'interaction entre les lymphocytes et les cellules endothéliales contrôle l'entrée des lymphocytes dans les territoires lymphoïdes : leur maintien dans ces sites inflammatoires y contrôle leur retour dans la circulation ; enfin il faut ajouter la génération et la prolifération in situ de lymphocytes spécifiques. La recirculation dépend du degré de différenciation des lymphocytes.

Les récepteurs du homing ne sont **pas spécifiques de l'antigène** : leur expression et leur spécificité ne sont pas influencés par la présence de ce dernier.

Cependant la stimulation antigénique entraîne des modifications des organes lymphoïdes secondaires qui influent sur ces récepteurs : l'augmentation des débits sanguin et lymphatique (par un facteur de 10 à 25), l'augmentation de la rétention des lymphocytes dans les tissus inflammés entraîne, 5 à 7 jours après la stimulation, une multiplication du poids (jusqu'à 15 pour un ganglion). Ceci augmente simplement le nombre de lymphocytes disponibles et donc la probabilité de rencontre entre l'antigène en cause et son lymphocyte spécifique.

Au cours de la prolifération et l'expansion clonale localisées in situ secondaires à la stimulation antigénique survient une reprogrammation des potentialités d'écotaxie avant toute nouvelle migration. Elle se caractérise par un affinement des spécificités et une restriction des cellules effectrices pour mieux cibler ces dernières lors d'une stimulation ultérieure.

IV-1-2 Les cellules endothéliales cubiques des veinules post-capillaires

Le passage du sang dans les organes lymphoïdes secondaires se fait au niveau d'un endothélium spécialisé, cuboïde, des veinules post-capillaire (**HEV**).

Les jonctions inter-cellulaires entre les HEV ne sont pas fortes, serrées, expliquant la possibilité de transmigration des lymphocytes. En microscopie électronique ces cellules apparaissent avec un appareil de Golgi très développé et riches en polyribosomes, réticulum endoplasmique et en vésicule sécrétoires, ce qui traduit leur intense activité métabolique. L'adhérence se fait par un phénomène de contact inter-cellulaire qui est spécifique, dépendant des lymphocytes (sous-population, état d'activation, stade de différenciation, stimulation antigénique) et de la localisation des HEV (ganglion périphérique, GALT, BALT, etc...).

Les HEV sont retrouvées dans toutes les espèces de mammifères et sont caractérisées par un endothélium rebondi parsemé de lymphocytes adhérents et infiltrés. Elles existent dans tous les organes lymphoïdes secondaires à l'exception de la rate, où le passage des lymphocytes se fait au niveau des sinus marginaux médullaires. On les retrouvent dans les

zones para-folliculaires T-dépendantes. Elles gouvernent cependant indifféremment la migration de tous les lymphocytes, qu'ils soient T ou B.

Elles sont absentes des organes lymphoïdes primaires et des organes non lymphoïdes normaux. Il existe des structures apparentées cependant dans des tissus non lymphoïdes atteints d'inflammation chronique (ex : synovium de polyarthrite rhumatoïde).

L'interaction entre les lymphocytes circulants et les cellules endothéliales des veinules post-capillaires est un phénomène stochastique favorisé par le diamètre des veinules (7 à 30 µ) qui optimise les probabilités de collision. Après environ 12 secondes de contact entre les deux partenaires la liaison est irréversible. Dans les PP environ 25 % des lymphocytes du flux sanguin adhèrent aux HEV, soit $1,4.10^4$ lymphocytes/ganglion/seconde. Leur nombre est multiplié par 10 après stimulation antigénique qui augmente le flux sanguin par des mécanismes adaptatifs immédiats (vasodilatation, ouverture de shunt artério-veineux) et tardifs (néoangiogénèse avec formation de nouvelles veinules post-capillaires).

La liaison du lymphocyte à la cellule endothéliale fait intervenir un récepteur membranaire lymphocytaire reconnaissant un ligand spécifique exprimé à la surface de la cellule endothéliale. Le passage des lymphocytes entre les cellules endothéliales ou diapédèse se fait en 5 à 10 minutes, vraisemblablement guidé par un gradient chimiotactique d'origine inconnue. Les deux partenaires subissent des modifications morphologiques : la cellule endothéliale réoriente son appareil de Golgi vers la zone de jonction avec le lymphocyte (activité sécrétoire) et le lymphocyte se déplace noyau en avant suivi d'un uropode, contournant les jonctions maculaires inter-endothéliales.

IV-1-3 Mise en évidence du phénomène d'écotaxie

Dès 1964 grâce à d'élégantes expériences de recirculation de lymphoblastes radiomarqués Gowans et Knight ont montré que la migration des lymphocytes obéit à une spécificité de localisation dictée par leur origine. Chez le rat les lymphoblastes prélevés au niveau du canal thoracique, radiomarqués et réinjectés par voie intra-veineuse se localisent préférentiellement dans les ganglions mésentériques et l'intestin. En 1976, Stamper et Woodruff ont mis au point un test de liaison in vitro des lymphocytes sur coupe de tissu lymphoïde congelé qui a rapidement permis de confirmer la spécificité de la liaison lymphocyte/cellule endothéliale des veinules post-capillaires. Ainsi les lymphoblastes des ganglions mésentériques (du GALT) se lient préférentiellement aux HEV des PP (environ 40 fois mieux qu'à celles des ganglions périphériques).

L'existence de ce phénomène d'écotaxie conforte l'hypothèse d'un système immunitaire muqueux bien individualisé comprenant l'intestin, le poumon, les glandes mammaires et les muqueuses vaginales et utérines qu'étayaient déjà les similarités anatomiques entre les PP et les tissus lymphoïdes de ces autres organes, la production commune d'anticorps de classe IgA, l'apparition, après immunisation orale, de plasmocytes à IgA dans l'intestin mais aussi dans les autres territoires. Il existe cependant au sein du MALT des spécificités régionales: les lymphocytes intestinaux migrant préférentiellement dans les PP comparativement aux ganglions médiastinaux, l'inverse étant observé pour les lymphocytes d'origine pulmonaire.

Les **lymphocytes matures vierges** recirculent dans tout l'organisme pour augmenter la probabilité de rencontre d'un clone faiblement représenté avec son antigène spécifique. Les **cellules mémoires** recirculent dans tous les tissus similaires à celui où a eu lieu la première rencontre avec l'antigène, où elles ont donc le plus de chance de l'y rencontrer à nouveau. Enfin, les **cellules effectrices** sont directement adressées dans l'organe cible où se trouve l'antigène pour y accomplir leur fonction et y mourir.

*La grande majorité des lymphocytes T circulants sont des lymphocytes "naïfs"," vierges", n'ayant jamais rencontré leur antigène, de phénotype L-sélectine$^+$, CD45RA$^+$, alors que les lymphocytes T mémoire sont L-selectine$^-$,CD45RO$^+$. De même, la plupart des lymphocytes B circulants sont des lymphocytes naïfs, IgM$^+$,IgD$^+$, retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires au niveau du manteau, alors que les lymphocytes B mémoire se retrouvent au niveau du centre germinatif. La seule exception à l'absence de restriction de homing des lymphocytes naïfs concernent les lymphocytes B CD5$^+$ et les lymphocytes T à TCR*11 *qui migrent préférentiellemnt dans les épithéliums.*

IV-2 Bases moléculaires

En réponse aux différents stimuli produits au cours d'une réponse inflammatoire, les cellules endothéliales sont capables de synthétiser des médiateurs qui induisent une vasodilatation (PGI_2, NO), qui

activent les leucocytes (IL-8, PAF). Sous l'effet de la thrombine, de l'histamine libérées on observe une translocation des molécules d'adhérence à partir des granules de stockage vers la membrane de ces cellules.

Sous l'effet de l'IL-1, du TNF9 ces cellules endothéliales produisent trois types de molécules d'adhérence appartenant à des familles différentes :

- **sélectines** et leurs ligand oligosaccharidiques
- **intégrines** et leurs ligands appartenant à la super-famille des Ig
- autres molécules d'adhérence telles que le CD44.

On peut donc concevoir le phénomène d'écotaxie comme un phénomène actif, comprenant au moins trois étapes. La première **(roulement)** est représentée par l'interaction entre un récepteur du homing (HR) d'expression constitutive sur le lymphocyte et son ligand d'expression modulée sur l'HEV. Cette liaison est faible et transitoire et n'a pour seule fonction que de ralentir le passage des lymphocytes. En l'absence d'**activation**, qui représente la deuxième étape, susceptible d'induire l'apparition de **mécanismes** d'**adhérence** plus forts constituants la troisième étape on aboutit au relargage du lymphocyte dans le courant circulatoire.

IV-2-1 Sélectines

La première étape ou "rolling" fait intervenir les **sélectines** et leurs ligand oligosaccharidiques

IV-2-1-1 Structure

Les sélectines sont parfaitement identifiées depuis 1989. On en reconnaît trois selon leur origine:

- la E-sélectine (**CD62E**) exprimée sur les cellules endothéliales activées par l'Il-1 ou le TNF 9 ;
- la P-sélectine (**CD62P**) exprimée principalement sur les plaquettes activées par l'héparine ou l'histamine, mais aussi sur les cellules endothéliales activées de la même façon
- la L-sélectine (**CD62L**) d'expression constitutive à la différence des deux précédentes sur les lymphocytes.

*Leur structure est homologue. Ce sont des glycoprotéines membranaires avec une courte portion intra-cytoplasmique. Sa portion extra cellulaire comporte un domaine N-terminal de 120 AA présentant une homologie de structure avec les **lectines**. L'existence de nombreux AA chargés positivement explique la spécificité de liaison pour les polysaccharides anioniques (mannose 6 phosphate et dérivés) par ailleurs dépendante de la présence de **calcium**. Y fait suite un domaine de 33 AA ressemblant au facteur de croissance épidermique (**EGF** "epidermal growth factor"). Enfin la portion la plus proche de la membrane est composée de plusieurs domaines de 62 AA appelés **SCR** pour "short consensus repeat", constitués d'unités répétitives retrouvées dans les protéines régulatrices du complément se liant aux composants C3 et C4 (récepteur du complément CR1, CR2 ; C4bp ou C4 binding protein, DAF ou decay accelerating factor, facteur H, facteur I) mais aussi dans le récepteur de l'IL-2 et le facteur XIII de la coagulation (6 SCR pour la E-sélectine, 9 pour la P et 2 pour la L). Le rôle des SCR serait de maintenir à distance de la surface cellulaire les domaines lectines et EGF pour faciliter les interactions cellulaires.*

L'épitope reconnu (sialyl Lewis x) se situe au sein d'un domaine de type mucine, riche en sérine et en thréonine et fortement O-glycosylé. La présence d'acide sialique est critique pour la reconnaissance par la L-sélectine; celle-ci est en effet abolie par les sialidases, facteur de virulence de certains germes (vibrio cholerae) capables ainsi d'interférer avec le homing des cellules immunocompétentes. De plus le degré d'agrégation des oligosaccharides et celui de leur sulfatation sont aussi cruciaux. Ils dictent en partie la capacité de liaison au CD62L, expliquant que ces molécules, de distribution tissulaire large, ne remplissent leur fonction d'adressines que lorsque ces deux paramètres concourent à l'expression correcte de l'épitope.

IV-2-1-2- Ligands

Le ligand de la L-sélectine est reconnu chez l'homme et la souris par un Ac mcl, MECA-79, qui se lie à un épitope oligosaccharidique partagé par trois adressines:

- **GlyCAM1** (glycolysation dependent cell adhesion molecule 1),
- **CD34**
- et **MAdCAM1** (mucosal addressin cell adhesion associated molecule 1).

GlyCAM1 *est une glycoprotéine de 50 kD principalement retrouvée au niveau des HEV des ganglions périphériques, fortement glycosylée, à structure mucine-like, maintenue à la surface de la cellule endothéliale par liaison à une protéine transmembranaire non identifiée à ce jour. La liaison à la L-sélectine se fait principalement par une interaction lectine (L-sélectine)/sucre (GlyCAM1). Des interactions de type protéine/protéine ont été postulées, mais ne seraient qu'accessoires (directes ou indirectes, par maintien de la bonne conformation du domaine lectine).*

CD34 *a un poids moléculaire de 90 kD et une distribution tissulaire large: on le retrouve notamment sur les cellules souches hématopoïétiques. En fonction du degré de sulfatation de ses oligosaccharides il sert de ligand au CD62L, essentiellement aussi dans les ganglions périphériques.*

Le troisième ligand, ***MAdCAM1****, reconnu chez la souris par l'Ac mcl MECA-367, est une adressine constitutive des muqueuses et inductible par les cytokines dans les foyers inflammatoires. Sa structure est originale, associant deux domaines N-terminaux ayant des homologies avec ICAM-1, suivis par un domaine de type mucine et enfin par un domaine homologue au deuxième domaine constant des chaînes lourdes des IgA (IgC*9*2). Il s'agit donc d'une molécule composite capable de servir à la fois de ligand à la sélectine CD62L par son domaine de type mucine, mais aussi à une intégrine,* 9$_4$9$_7$ *(CD49d/*9$_7$*) par son domaine ICAM-like. Son expression est induite par des cytokines, telles que le TNF*9 *et l'IL-1 dans les territoires non muqueux au cours des inflammations chroniques.*

Quoiqu'il en soit les sélectines reconnaissent spécifiquement des polysaccharides. Cette liaison est dépendante du calcium dont le rôle serait de protéger le récepteur de l'action de la plasmine. Le même effet inhibiteur, restreint aux HEV du compartiment systémique, est observé in vitro, mais aussi in vivo, avec des sialidases extraits de Vibrio cholerae ou Clostridium perfringens. Ceci pourrait être un facteur de virulence pour ce dernier une fois la barrière intestinale franchie, empêchant l'extravasion des lymphocytes au niveau des glanglions périphériques.

IV-2-2 Chémokines et CD 44

L'activation des lymphocytes arrêtés sur les HEV ou sur un endothélium au sein d'un foyer inflammatoire est secondaire à l'action de différents médiateurs solubles, appelés **chémokines** car fonctionnant comme des facteurs chimiotactiques: le fragment C5a du complément, le Platelet activating Factor "PAF"), l'IL-8, et les peptides N-formylés des parois bactériennes tels que le fMLP (N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine) (voir cours spécifique, *cytokines et chimiokines*).

L'expression spécifique des récepteurs sur les cellules explique le recrutement préférentiel :

- *CCR7 récepteur du CCL21 (ou SLC pour secondary lymphoïd chemokine) et du CCL19 (ou MIP-3*β *pour macrophage inflammatory protein 3*β*) sur le lymphocyte T*
- *CXCR6 récepteur du CXCL13 (ou BCL-1 pour B cell attracting 1) sur le lymphocyte B*

Ces différents médiateurs sont retenus à la surface des cellules endothéliales par des glycosaminoglycans, tel que le **CD44** qui possède une extrémité N-terminale de 90 AA présentant une homologie de structure avec les protéoglycans de cartilage permettant une interaction protéine-acide hyaluronique.

La fixation des chemokines aboutit à augmenter leur concentration locale dans un foyer inflammatoire, les protégeant ainsi de la dilution plasmatique. Les récepteurs de ces différentes chémokines appartiennent tous à la superfamille des **serpentines**, glycoprotéines à sept domaines transmembranaires couplées à des protéines liant le GTP (voir cours spécifique).

IV-2-3 92- et 91-Intégrines

L'activation des lymphocytes alors qu'ils sont faiblement attachés aux HEV par l'interaction sélectine-adressine est responsable de l'induction de molécules d'adhérence secondaire beaucoup plus puissantes, capables donc de renforcer la liaison et de favoriser la diapédèse. De telles molécules se retrouvent dans la famille des 9**2 intégrines** ou celle des 9**1-intégrines**.

IV-2-3-1 92-Intégrines

Le représentant type de la première est la molécule **LFA-1** (leucocyte function associated antigen-1), hétérodimère 9_2, reconnu par les Ac mcl des cluster **CD11a (**9**)** et **CD18 (**9**2)**. On lui connaît deux ligands sur les cellules endothéliales :

- **ICAM-1** ("intercellular adhesion molecule 1")

qui appartient à la superfamille des Ig car possédant cinq domaines "Ig-like" et dont l'expression cellulaire est ubiquitaire, très fortement inductible sur les cellules endothéliales dans un site d'inflammation.

- **ICAM-2** ("intercellular adhesion molecule-2")

qui possède deux domaines Ig-like mais dont l'expression cellulaire est beaucoup plus restreinte puisque seuls les lymphocytes et les cellules endothéliales en possèdent sans que l'inflammation n'en régule le niveau d'expression.

Une autre différence entre les deux molécules réside dans la capacité de liaison au CR3 (autre β*2 intégrine) que seule ICAM-1 possède. ICAM-2 serait donc plus impliquée dans les phénomènes de recirculation générale, au vu de son expression constitutive, alors qu'ICAM-1 interviendrait dans la circulation spécifique dans les sites d'inflammation. Une autre différence réside dans la possibilité pour ICAM-1 de se lier à d'autres ligands que LFA-1, notamment le* ***CD43****, ou sialophorine, absent dans le syndrome de* WISKOTT-ALDRICH.

IV-2-3-2 VLA-4 et son ligand VCAM-1

Les cellules endothéliales expriment à leur surface une molécule d'environ 110 kD appelée **VCAM-1** ("vascular cell adhesion molecule-1") ou INCAM-110 ("inductible cell adhesion molecule-110") qui est inductible grâce à la présence d'une région de type NF-kB en 5' de son gène tout comme celui de la E-sélectine.

*Cette induction est provoquée par l'IL-1, le TNF*9*, mais aussi l'Il-4 à la différence d'ICAM-1. Son expression est maximum de la 6ème à la 12ème heure et est plus prolongée que celle de la E-sélectine. On retrouve VCAM-1 sur des cellules d'origine non-vasculaire comme les cellules dendritiques du ganglion, les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules synoviales des articulations inflammatoires.*

Son ligand est une intégrine, **VLA-4** ou very late antigen-4 ($9_4 9_1$ ou **CD49d/CD29**) possédant sept domaines Ig-like dont les plus homologues entre eux (1 et 4) sont impliqués dans l'adhérence non seulement aux cellules endothéliales, mais aussi aux cellules stromales et dendritiques. Elles joueraient un rôle dans les tissus non lymphoïdes soumis à une inflammation chronique.

IV-2-4 Autres interactions moléculaires

En plus de ces récepteurs spécifiques pour l'écotaxie d'autres systèmes ligand/récepteur de distribution générale interviendraient dans les interactions lymphocytes-cellules endothéliales des veinules post-capillaires. On peut ainsi citer le **CD31**, **LFA-3**, **CD2**, **CD4**, **CD8**, les molécules du **CMH**.

Le ***CD31*** *est une glycoprotéine de 130 kD, appartenant à la super-famille des Ig, responsable d'adhérence homo- ou hétérotypique, d'expression constitutive sur les cellules endothéliales et inductible sur les plaquettes, les polynucléaires, les monocytes et certaines sous-populations de lymphocytes.*

LFA-3 *("leukocyte function associated antigen-3" ou* ***CD58)*** *exprimé par les cellules endothéliales et* ***CD2*** *son ligand sur les lymphocytes appartiennent tous les deux à la super-famille des Ig. Leur rôle est très controversé dans l'adhérence ; ils interviendraient plus dans l'activation des lymphocytes.*

*Il en va de même pour les interactions entre les molécules **CD4** et **CD8** et les molécules du CMH qui sont inductibles par l'IFN\ sur les cellules endothéliales.*

IV-3 RÉGULATION

Le contrôle de la spécialisation des HEV se fait par le microenvironnement. L'interruption des lymphatiques afférents se traduit par une modification morphologique des HEV, qui de cubiques deviennent plates. Cette action pourrait être la conséquence indirecte de la privation en antigène stimulant dans le fLux lymphatique. Cette interruption se traduit par la déplétion en cellules dendritiques interdigitées et en nombreuses cytokines capables d'induire l'expression des molécules d'adhérence.

Notre compréhension du phénomène d'écotaxie a évolué d'une vision simpliste d'un "homing" gouverné par une interaction unique d'un couple HR/adressine dont la spécificité de distribution tissulaire dicte la spécificité de migration, vers un mécanisme en trois étapes associant séquentiellement une combinaison unique choisie parmi un répertoire de trois sélectines, environ vingt chémokines et quatre à cinq intégrines. **L'unicité de la combinaison dicte la spécificité de migration.**

RESUME

Les lymphocytes prennent naissance dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques. Ils se différencient dans les organes lymphoïdes primaires, en dehors de toute stimulation antigènique : les lymphocytes T dans le thymus et les lymphocytes B dans la moelle osseuse chez les mammifères ou la bourse de FABRICIUS chez les oiseaux. Le résultat de cette différenciation est l'acquisition d'un récepteur d'antigène fonctionnel (BCR, TCR), en absence de la présence de ce dernier. Après avoir acquis leur répertoire et la tolérance au soi, ces lymphocytes matures, naïfs, sont exportés en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires que sont la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses.

Recirculant entre ces différents territoires les lymphocytes naïfs ont ainsi l'opportunité de rencontrer leur antigène spécifique. Le système lymphatique est un système de vaisseaux qui draine tous les tissus et réinjecte la lymphe dans la circulation sanguine, via le canal lymphatique droit et le canal thoracique gauche. Les ganglions sont placés sur ce réseau comme des filtres sur les voies de pénétration de l'antigène alors que la rate l'est sur le réseau sanguin. Les tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses, ensemble de tissus lymphoïdes non-encapsulés des zones sous-muqueuses des systèmes respiratoire, digestif et génito-urinaire sont indépendant du compartiment systémique et couvrent la principale porte d'entrée des agents pathogènes (400 m^2).

Le passage du sang dans les tissus, appelé diapédèse, se fait au niveau des veinules post-capillaires, qui possède un endothélium spécialisé fait de cellules cuboïdes. La circulation préférentielle des lymphocytes (écotaxie ou "homing") se fait grâce à l'expression de différents couples d'adressines, exprimées sur ces cellules endothéliales et de sélectines et d'intégrines exprimés sur les lymphocytes.

POUR EN SAVOIR PLUS:

BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique.* Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 661-72-65

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 3-15

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997: 26-31

GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 : 123-150

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2001 : 157-169

TESTER-VOUS

1 - La bursectomie néo-natale entraîne chez le poulet :

A - une diminution de la production d'anticorps
B - une hyperplasie du thymus
C - une absence de plasmocytes
D - une aplasie de la zone paracorticale des ganglions
E - l'absence de cellules dendritiques dans les ganglions

2 - Parmi les structures suivantes qui font partie d'organes lymphoïdes, indiquez celles qui sont des régions B dépendantes :

A - follicules de Malpighi
B - corpuscule de Hassal
C - cordons médullaires ganglionnaires
D - gaîne péri-artérielle splénique
E - centre clair germinatif

3 - Parmi les différentes régions d'un ganglion lymphoïde énumérées ci-dessous, indiquez celles qui sont des zones B-dépendantes :

A - centre clair germinatif
B - zone paracorticale
C - follicule lymphoïde secondaire
D - sinus marginal
E - follicule lymphoïde primaire

4 - Parmi les maladies ou situations expérimentales énoncées ci-dessous, quelles sont celles qui s'accompagnent d'un déficit T?

A - bursectomie (chez le poulet)
B - thymectomie néo-natale
C - maladie de Bruton
D - oedème angioneurotique
E - syndrome de DiGeorge

LES IMMUNORÉCEPTEURS

I - INTRODUCTION

II - STRUCTURE DES IMMUNORÉCEPTEURS
- II - 1 - Les sous-unités de reconnaissance
- II - 2 - Les sous-unités de signalisation

III - ACTIVATION PAR LES IMMUNORÉCEPTEURS
- III - 1 - Phosphorylation des ITAMs
  - III - 1 - 1 - La famille des kinases *src*
  - III - 1 - 2 - Mécanisme de phosphorylation des ITAMs
- III - 2 - Les kinases de la famille *SYK*
- III - 3 - Recrutement des molécules adaptatrices
- III - 4 - Les deux voies d'activation intra-cellulaire.
  - III - 4 - 1 - La voie calcique
  - III - 4 - 2 - La voie ras

IV - RÉGULATION DES SIGNAUX TRANSMIS PAR LES IMMUNORÉCEPTEURS
- IV - 1 - L'autorégulation des immunorécepteurs
  - IV - 1 - 1 - Régulation positive
  - IV - 1 - 2 - Régulation négative
- IV - 2 - Les corécepteurs
  - IV - 2 - 1 - Régulation positive
  - IV - 2 - 2 - Régulation négative

LES IMMUNORÉCEPTEURS : OBJECTIFS

Niveau A :

- **Définition des immunorécepteurs**
- **Architecture générale (reconnaissance, signalisation)**
- **Les trois types : BCR, TCR, RFc**
- **Notions d'ITAM, d'ITIM**
- **Grandes voies de signalisation**

Niveau B :

- **Familles de kinases (*src, syk*)**
- **Structure générale (domaines SH2, SH3)**
- **Molécules adaptatrices : fonctions**
- **phosphatases**
- **mécanismes généraux de régulation**

LES IMMUNORÉCEPTEURS

I - INTRODUCTION

Au cours d'une réponse immunitaire adaptative, les antigènes stimulent le système immunitaire parce ce qu'ils se fixent sur des récepteurs exprimés à la surface des lymphocytes et des cellules myéloïdes. Ces récepteurs, qui partagent un ensemble de propriétés structurales et fonctionnelles communes, sont appelés **immunorécepteurs**. Ils doivent être vus comme des **molécules de couplage**.

La reconnaissance spécifique de l'antigène relève du module extra-cellulaire de l'immunorécepteur, propre à chacun d'entre eux, alors que les effets biologiques qui résulte du couplage sont portés par des voies de signalisation qui peuvent être communes ou inter-connectées.

Ils existent **trois** types d'immunorécepteurs.

- Le **BCR** ou *B cell receptor* est exprimé exclusivement à la surface des lymphocytes B.
- Le **TCR** ou les *T cell receptor* est exprimé exclusivement à la surface des lymphocytes T.
- Les récepteurs des Fc des immunoglobulines (**RFc**) ont une expression plus ubiquitaire.

Le BCR permet la liaison des **antigènes natifs**, solubles, tels qu'ils se présentent lorsqu'ils pénètrent dans l'organisme. Le TCR se lient à des **peptides** résultant de la dégradation intracellulaire des antigènes internalisés et apprêtés dans des cellules présentatrices d'antigène, et présentés par les molécules d'histocompatibilité exprimées à la surface de ces cellules. Les RFc ne se lient ni à l'antigène natif ni à ses produits de dégradation, mais aux **portions Fc d'anticorps complexés** à l'antigène par leurs portions Fab. C'est donc une liaison indirecte de l'antigène, par l'intermédiaire des anticorps, sous forme de complexes immuns.

La liaison de l'antigène, quelle qu'en soit la forme, aux immunorécepteurs exprimés à la surface des cellules immunocompétentes, va enclencher une cascade d'évènements intra-cellulaires, appelée **activation cellulaire**, qui aboutit à la réalisation de programmes cellulaires de transcription de gènes ou de sécrétion de molécules solubles.

Selon le type cellulaire, les effets biologiques sont différents : après engagement et agrégation de leurs immunorécepteurs respectifs (BCR, TCR ou RFc), et selon leur stade de différenciation, le lymphocyte B donnera naissance au plasmocyte sécréteur d'anticorps, le lymphocyte T au lymphocyte T cytotoxique ou au lymphocyte T auxiliaire, et les cellules NK exprimeront leur potentiel cytotoxique.

II - STRUCTURE DES IMMUNORÉCEPTEURS

A l'exception du RFcγIIA/C (CD32), tous les immunorécepteurs sont des complexes multicaténaires, constitués d'un module de une à deux chaînes capables de reconnaître le ligand extracellulaire, et d'un module de signalisation de 2 à 6 chaînes, portant dans leur portion intra-cytoplasmique un même motif peptidique une double séquence YxxL/I, avec deux résidus tyrosine (Y dans la nomenclature à une lettre des acides aminés, L pour leucine et I pour isoleucine), séparés par 6 à 8 acides aminés quelconques. Ce motif est appelé **ITAM** pour ***I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **A**ctivation **M**otif*. Le message transmis par certains de ces récepteurs peut au contraire être une inhibition : on retrouve sur la portion

intra-cytoplasmique de la chaîne de signalisation non pas un ITAM, mais un **ITIM** pour ***I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **I**nhibitiontion **M**otif*, motif unique YxxL/I. Ces motifs permettent de coupler, après pontage par l'antigène, ces récepteurs aux différents effecteurs cytoplasmiques qui enclenchent les voies de signalisation intra-cellulaire ou d'internalisation. Le CD32 est un récepteur monocaténaire dont la chaîne unique assume les deux fonctions.

Bien que les différentes chaînes soient spécifiques à chaque type d'immunorécepteur, on voit donc que l'architecture générale est semblable. Cette homologie structurale est renforcée par l'appartenance de la majorité de ces chaînes à la superfamille des immunoglobulines.

II - 1 - Les sous-unités de reconnaissance

Les sous-unités de reconnaissance des immunorécepteurs sont des protéines transmembranaires. Elles sont capables de **fixer l'antigène**, directement ou indirectement, par leur portion extra-cellulaire, mais incapables de délivrer des signaux intra-cellulaire. Leur partie extra-cellulaire est constituée par un nombre variable de domaines possédant la structure caractéristique des domaines d'immunoglobulines.

La sous-unité de reconnaissance du BCR est une immunoglobuline ancrée dans la membrane plasmique.

La sous-unité de reconnaissance du TCR est formée par un hétérodimère (α/β ou γ/δ) dont chaque chaîne possède un domaine N-terminal variable et un domaine C-terminal constant, suivi d'un domaine transmembranaire et d'un court segment intracytoplasmique.

La sous-unité de reconnaissance des RFc est formée par une seule chaîne polypeptidique transmembranaire, appelée α. Il existe des RFc différents pour chaque classe d'immunoglobulines. Les RFcγ fixent les IgG, les RFcε fixent les IgE, les RFcα fixent les IgA, les RFcμ fixent les IgM et les RFcδ fixent les IgD. On distingue deux grands groupes de RFc selon leur affinité pour les immunoglobulines : les RFc de forte affinité, qui peuvent fixer les immunoglobulines sous forme monomérique, et les RFc de faible affinité qui ne peuvent fixer les immunoglobulines qu'agrégées ou complexées à un antigène multivalent. Par convention, les RFc de forte affinité sont dits de type I, et les RFc de faible affinité de type II ou III.

II - 2 - Les sous-unités de signalisation

Les sous-unités de signalisation sont constituées d'un petit domaine extracellulaire et d'un grand domaine intracellulaire. A la différence des unités de reconnaissance, elles peuvent **délivrer des signaux** à l'intérieur de la cellule, mais ne peuvent pas fixer l'antigène. Elles sont formées par une ou deux chaînes polypeptidiques transmembranaires reliées par des ponts disulfures. Elles sont associées aux sous-unités de reconnaissance grâce à des acides aminés chargés situés dans les régions transmembranaires.

L'immunoglobuline de surface du **BCR** est associée à un hétérodimère composé d'une chaîne **Igα (CD79a)** et d'une chaîne **Igβ (CD79b).**

Les chaînes $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ du **TCR** sont associées à un homodimère de **chaînes** ζ et à deux hétérodimères, **CD3**$\varepsilon\gamma$ et **CD3**$\varepsilon\delta$.

Dans la plupart des cas, la chaîne α des RFc est associée à un homodimère de **chaînes** γ**.** Dans les mastocytes, les RFcεI et les RFcγIIIA sont aussi associés à une chaîne tetraspan β.

Ces sous-unités de signalisation portent un nombre variable d'ITAM dans leur portion intra-cytoplasmique.

III - ACTIVATION PAR LES IMMUNORÉCEPTEURS

L'immunorécepteur est une molécule de **couplage** qui transmet des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule immunocompétente. Pour ce faire, non seulement il lui faut fixer l'antigène, mais encore ce dernier doit être capable d'agréger les sous-unités de reconnaissance. Seuls des antigènes multivalents sont capables de délivrer un message d'activation. L'agrégation des domaines extra-cellulaires des sous-unités de reconnaissance entraîne celle des portions intra-cytoplasmiques des sous-unités de signalisation qui leur sont étroitement associées.

L'activation cellulaire comprend des **réponses immédiates**, supportées par des réactions **enzymatiques,** et des **réponses tardives**, conséquences des premières et supportées par l'expression de gènes cellulaires responsables de la **synthèse de protéines** intervenant dans la différenciation et la prolifération cellulaire (cytokines, récepteurs de cytokines, kinases et cyclines).

L'engagement de l'immunorécepteur par l'antigène va pouvoir mobiliser, en fonction de l'état de différenciation de la cellule, des protéines qui associe des domaines catalytiques et des domaines d'interaction diverses, dont la combinatoire explique la diversité des réponses par les multiples cascades moléculaires mises en jeu.

On peut donc en effet observer des réponses à première vue contradictoires :

- prolifération et différenciation cellulaire
- anergie lymphocytaire (état actif de non-réponse
- progression ou arrêt de maturation
- voire mort cellulaire par apoptose (AICD pour activation induced cell death)

La **phosphorylation** des protéines joue un rôle crucial dans la signalisation : elle résulte de la balance entre l'activité des **kinases** qui fixent des groupes phosphates, et des **phosphatases** qui les hydrolysent. Une protéine phosphorylée devient un site de recrutement pour une autre protéine grâce à la liaison à un domaine spécifique. La phosphorylation permet donc des interactions entre protéines intra-cellulaires, modifiant leur localisation ou leur fonction.

L'immunorécepteur a donc pour fonction de transformer un **signal mécanique**, l'agrégation des récepteurs, en un **signal chimique**, la phosphorylation des protéines.

La transduction des signaux par les immunorécepteurs procède en **trois temps**.

- D'abord, les tyrosines des ITAMs des sous-unités de signalisation agrégées sont phosphorylées par des kinases. Ces kinases appartiennent à la famille des **kinases *src***.
- Dans un deuxième temps, les tyrosines phosphorylées des ITAMs offrent des sites de recrutement pour d'autres kinases. Ces kinases appartiennent à la famille des **kinases *syk*,** qui peuvent alors s'autophosphoryler et/ou être phosphorylées par des kinases *src*. Les kinases *syk* phosphorylées phosphorylent alors des molécules dépourvues d'activité catalytique qu'on appelle molécules adaptatrices.
- Dans un troisième temps, ces **molécules adaptatrices** recrutent d'autres molécules qui sont phosphorylées par une kinase *syk*. Ces molécules sont à l'origine de voies métaboliques qui propagent les signaux dans les cellules et conduisent à l'activation cellulaire.

III - 1 - Phosphorylation des ITAMs

III - 1 - 1 - La famille des kinases *src*

Les kinases *src* des protéines tyrosine kinases (PTK), capables donc de phosphoryler des protéines sur un résidu tyrosine. Elles ont une architecture commune. Elles sont ancrées dans la membrane de manière covalente par leur extrémité N-terminale .

Elle s'y lie à un acide myristique localisé préférentiellement dans des structures particulières de la membrane, d'une centaine de nanomètres, riches en cholestérol et en glycosphingolipides, qu'on appelle ***microdomaines****.*

De la portion N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on leur décrit :

- un "domaine unique" (dont la séquence est propre à chaque kinase), qui permet l'association, directe ou indirecte, de certaines kinases src avec les immunorécepteurs non agrégés.

- deux domaines conservés par tous les membres de la famille, d'où leur dénomination SH pour Src Homology domain : un ***domaine SH2*** *et un* ***domaine SH3****. Les domaines SH2 et SH3 fonctionnent comme des domaines de reconnaissance. Les domaines SH2 se fixent à des séquences contenant un résidu tyrosine phosphorylé. Les domaines SH3 se fixent à des séquences contenant le motif xPxxP, ou P est une proline et x un acide aminé quelconque. Les acides aminés en aval de la tyrosine, ou ceux qui entourent les prolines sont variables, mais pas quelconques puisqu'ils restreignent la spécificité des domaines SH2 ou SH3 avec leurs cibles.*

- A côté de ces domaines de reconnaissance existe un domaine catalytique qui contient les séquences responsables de l'activité enzymatique de la kinase.

- enfin on trouve un domaine régulateur C-terminal qui contrôle l'activité de la kinase.

Les kinases *src* sont diversement exprimées dans les cellules immunocompétentes : les lymphocytes T expriment principalement *fyn* et *lck*, les lymphocytes B *Lyn* et *Blk* et les cellules myéloïdes *lyn*, *src*, *fgr* et *hck.*

Ce sont les kinases *src* qui déclenchent les premiers évènements de la cascade de signalisation en phosphorylant les ITAMs des immunorécepteurs.

III - 1 - 2 - Mécanisme de phosphorylation des ITAMs

Nous ne décrirons ici que les mécanismes généraux de l'activation, qui sont communs, renvoyant aux chapitres sur l'activation des lymphocytes B, des lymphocytes T pour le détail des spécificités, notamment les kinases impliquées.

L'agrégation de l'immunorécepteur par l'antigène concentre ce dernier dans les microdomaines, riches en kinases *src* et en molécules impliquées dans les premières étapes de la signalisation.

Le rapprochement des kinases src et des ITAM portées par les sous-unités de signalisation des immunorécepteurs ne suffit pas pour que ces derniers soient phosphorylés par les premières. Il faut que les kinases src soient activées.

Dans la kinase src inactive, la tyrosine phosphorylée du domaine régulateur est liée au domaine SH2, dont le repliement masque le domaine catalytique. L'agrégation des immunorécepteurs entraîne une phosphatase membranaire, CD45, qui déphosphoryle la tyrosine du domaine régulateur, libérant ainsi le domaine catalytique.

Les kinases src activées ont pour cibles les tyrosines des ITAM, puis celles des kinases de la famille syk.

III - 2 - Les kinases de la famille *syk*

La famille des kinases *syk* se compose de deux membres, *syk* et ZAP-70 (*Zêta Associated Protein of 70 kD*). Elles possèdent deux domaines SH2 et un domaine tyrosine kinase. *Syk* est exprimée dans les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules myéloïdes ; ZAP-70 est exprimée dans les lymphocytes T et les cellules NK mais pas dans les lymphocytes B.

Protéines non ancrées dans la membrane plasmique, les kinases syk se fixent aux tyrosines phosphorylées des ITAMs. Pour que l'interaction soit stable, il faut que les deux domaines SH2 interagissent simultanément avec les deux tyrosines des ITAMs.

L'activité protéine kinase de syk et ZAP-70 est régulée par la phosphorylation de tyrosine, facilitée par l'agrégation dans les microdomaines et le contact avec les ITAM et les kinases src.

III- 3 - Recrutement des molécules adaptatrices

Un certain nombre des substrats des kinases *syk* sont des molécules adaptatrices qui ont pour fonction d'assembler les complexes moléculaires responsables de la signalisation.

Citons :

- LAT

LAT (Linker for Activation of T cells) est une protéine transmembranaire retrouvée dans les lymphocytes T, les cellules NK, les mastocytes et les plaquettes. LAT est localisée dans les microdomaines, où les kinases activées de la famille syk vont la phosphoryler sur plusieurs tyrosines. LAT va alors pouvoir recruter deux molécules adaptatrices appelées Grb2, qui interagit directement avec LAT, et SLP-76 (SH2 domain-containing Leukocyte Protein of 76 kD), qui interagit avec LAT par l'intermédiaire de Grb2. LAT recrute aussi une enzyme qui est une phospholipase C, la PLCγ1.

- Grb2

Grb2 (Growth receptors binding protein 2) possède deux domaines SH3 de part et d'autre d'un domaine SH2. Elle peut donc relier des molécules contenant des tyrosines phosphorylées (comme LAT) à d'autres molécules riches en prolines qui se fixent sur ces domaines SH3.

- SLP-76

SLP-76 possède un domaine SH2 C-terminal, une région centrale riche en prolines et plusieurs tyrosines situées à l'extrémité N-terminale. Elle est associée à LAT, et ses tyrosines sont phosphorylées par ZAP-70. Le résultat en est l'activation de la PLCγ-1.

- SLP-65

SLP-65 est l'homologue de SLP-76 dans les lymphocytes B. Une fois phosphorylée, elle recrute la protéine Grb2 et une PLCγ (la PLCγ2).

III - 4 - Les deux voies d'activation intra-cellulaire.

Au terme de cette signalisation, quel que soit le type cellulaire, l'activation se fait selon deux voies :

- la **voie calcique** qui déclenche des vagues de calcium (Ca^{2+}) à l'intérieur de la cellule.

- la voie ***ras*** qui aboutit à l'activation de kinases appelées les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*).

III - 4 - 1 - La voie calcique

Fixées sur SLP-65 ou sur LAT, les **PLC**γ sont phosphorylées par des kinases *syk* et par deux autres protéines tyrosine kinases :

- *Btk* (*Bruton's tyrosine kinase*) qui active la PLCγ 2 dans les lymphocytes B ou la PLCγ1 dans les mastocytes.

La Btk est la protéine déficitaire dans la maladie de Bruton, agammaglobulinémie liée au sexe

- *Itk* (*Inducible T cell kinase*) qui active la PLCγ1 dans les lymphocytes T

Ces kinases se lie au phosphatidylinositol (3,4,5)-tri-phosphate (PIP3) du feuillet interne de la membrane plasmique par un domaine appelé pleckstrin homology domain (domaine PH). Elles sont alors activées par phosphorylation due à des kinases de la famille src, ce qui leur permet d' activer les PLCγ.

L'effet résultant des PLCγ est l'augmentation du calcium intra-cellulaire cytosolique.

Les PLCγ1 et 2 clivent le phosphatidylinositol (4,5)-bi-phosphate (PIP2) en diacylglycérrol et en inositol(1,4,5)-tri-phosphate (IP3). Après liaison à des récepteurs sur le versant cytoplasmique du réticulum endoplasmique, l'IP3 stimule la sortie transitoire du Ca^{2+} hors du réticulum. Cet afflux de Ca^{2+} dans le cytosol provoque l'ouverture de canaux calciques sur la membrane cytoplasmique et, en conséquence, une entrée du calcium extracellulaire. Dans le cytosol, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} stimule, entre autre, l'activités de la calmoduline et la calcineurine. La fixation du Ca^{2+} sur la calmoduline permet à celle-ci de se fixer sur la calcineurine. L'activité phosphatase de la calcineurine est alors stimulée, ce qui lui permet de déphosphoryler le facteur de transcription NF-AT (Nuclear Factor-Activated T cells) qui peut ainsi passer la membrane nucléaire et activer la transcription des gènes de cytokines.

III - 4 - 2 - La voie *ras*

Les protéines *ras* font partie des petites GTP-ases intracellulaires de 21 kD, ancrées dans la membrane plasmique par leur extrémité C-terminale. Elles existent sous deux formes : une forme inactive, liée au GDP (Guanosine Di-Phosphate), et une forme active, liée au GTP (Guanosine Tri-Phosphate).

Grb2 joue un rôle essentiel dans l'activation de la voie ras. Une fois recrutée à la membrane, Grb2 permet le recrutement d'un facteur d'échange appelé sos (Son Of Sevenless). Sos active les protéines ras qui déclenchent l'activation en cascade de kinases dont les substrats terminaux sont les MAPK. Celles-ci peuvent alors entrer dans le noyau où elles activent des facteurs de transcription qui induisent l'expression de gènes de cytokines ou de molécules contrôlant la prolifération cellulaire.

IV - RÉGULATION DES SIGNAUX TRANSMIS PAR LES IMMUNORÉCEPTEURS

Il existe une régulation **positive** ou **négative** des signaux d'activation exercée par les immunorécepteurs eux-mêmes, ou par des corécepteurs associés.

IV - 1 - L'autorégulation des immunorécepteurs

IV - 1 - 1 - Régulation positive

Pour les immunorécepteurs possédant plusieurs sous-unités de signalisation, le **nombre d'ITAM** phosphorylés conditionne le degré de recrutement des protéines kinases *syk*, et donc l'amplitude du signal. Cette modulation de l'intensité du signal pourrait jouer un rôle important au cours de la sélection lymphocytaire dans le thymus.

IV - 1 - 2 - Régulation négative

Deux phosphatases, associées aux immunorécepteurs, sont capables, par un mécanisme inconnu, de déphosphoryler et d'inactiver les kinases *src* et *syk.* Ce sont :

- la tyrosine phosphatase **SHP-1** (*SH2 domains-containing protein tyrosine Phosphatase-1*)
- l'inositol phosphatase **SHIP** (*SH2 domain-containing 5í inositol phosphatase*), qui déphosphorylent des molécules impliquées dans les voies d'activation déclenchées par les immunorécepteurs.

Des modèles de souris KO pour ces phosphatases (SHP-1$^{-/-}$, appelées motheaten, ou SHIP$^{-/-}$) confirme cette régulation négative : de telles souris présentent une hyperréactivité lymphocytaire.

IV - 2 - Les corécepteurs

Des corécepteurs, coagrégés avec les immunorécepteurs, sont capables de réguler positivement ou négativement les signaux transmis par ces derniers après liaison à l'antigène. Leur reconnaissance de l'antigène est le plus souvent **indirecte**, par le biais de molécules fixées sur ce dernier (complément par exemple).

IV - 2 - 1 - Régulation positive

Le corécepteur **CD19** est exprimé à la surface des **lymphocytes B** en association avec le **CD21**, encore appelé CR2 car récepteur pour les fragment C3dg, et C3d du troisième composant du complément (C3).

Tout antigène recouvert de ces fragments pourra stimuler simultanément le BCR et le complexe CD19/CD21. Cette coagrégation permet la phosphorylation du CD19 par les kinases src. CD19 activé et phosphorylé va recruter une kinase à domaine SH2, la PI-3 kinase qui va phosphoryler le PIP-2 en PIP-3 et ainsi recruter les kinases Btk et Itk. Il y a donc synergie des deux systèmes.

Le corécepteur **CD28** exprimé à la surface des **lymphocytes T** agit de même dans l'activation de ces cellules. Une simple stimulation du TCR (**signal 1**) de lymphocytes T normaux induit une anergie cellulaire, voire une apoptose. Pour activer des cellules T normales, il faut que celles-ci reçoivent un second signal (**signal 2**). C'est la fonction du CD28 qui a pour ligand une molécule membranaire appelée B7 exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigène.

Le contact entre la cellule présentatrice et le lymphocyte T permet l'interaction de B7 et de CD28 et l'agrégation de CD28. Le CD28 agrégé est phosphorylé et recrute, comme CD19, la PI-3 kinase qui agit en synergie avec les signaux transduits par le TCR. L'agrégation de CD28 permet de plus une redistribution des TCR dans les microdomaines, facilitant leur phosphorylation et amplifiant donc les signaux transmis.

IV - 2 - 2 - Régulation négative

Les phosphatases SHIP et SHP-1 peuvent être recrutées par des corécepteurs qui régulent négativement l'activation cellulaire induite par les immunorécepteurs. Citons le CD32 ou RFcγIIB et certains récepteurs des cellules NK. Les sous-unités de signalisation porte un motif **ITIM,** qui, une fois phosphorylé par les kinases *src*, va recruter SHP-1 ou SHIP pour le CD32. La conséquence en est le blocage de la voie calcique et de la voie *ras*.

Résumé

Les immunorécepteurs reconnaissent, directement ou indirectement, les antigènes sous leurs différentes formes. Ils comprennent les récepteurs pour l'antigène exprimés par les lymphocytes B (BCR), les récepteurs pour le complexe CMH-peptide exprimés par les lymphocytes T (TCR) et les récepteurs pour les complexes antigène-anticorps (RFc) exprimés par de nombreuses cellules lymphoïdes et myéloïdes. Lorsqu'ils sont agrégés à la surface des cellules qui les expriment, les immunorécepteurs délivrent des signaux qui conduisent ‡ l'activation cellulaire. Bien qu'ils aient des structures différentes, des ligands différents, des distributions cellulaires différentes, et bien qu'ils induisent des réponses biologiques différentes, les immunorécepteurs utilisent des mécanismes comparables pour stimuler les cellules. Les propriétés activatrices des immunorécepteurs dépendent en effet de la présence, dans leurs domaines intracytoplasmiques, d'un ou plusieurs motifs moléculaires appelés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAM). L'agrégation des immunorécepteurs induit la phosphorylation des tyrosines des ITAM. Ceux-ci fonctionnent alors comme des sites de liaison permettant le recrutement de molécules possédant des modules d'interaction moléculaire. Celles-ci comprennent des enzymes et des molécules adaptatrices. Ainsi s'organisent, autour des domaines intracytoplasmiques des immunorécepteurs agrégés, des complexes moléculaires où peuvent interagir les molécules effectrices et leurs substrats, et à partir desquels sont lancées des cascades de réactions qui propagent les signaux intracellulaires aboutissant à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et à l'activation de facteurs de transcription. Ces voies métaboliques sont régulées, positivement par d'autres molécules cytoplasmiques recrutées par des corécepteurs, et négativement par des molécules antagonistes, recrutées par les immunorécepteurs eux-mêmes ou par d'autres corécepteurs.

POUR EN SAVOIR PLUS:

LESOURNE R, DAERON M Transduction du signal par les immunorécepteurs *Revue Française des Laboratoires* , 2000, **327** : 29-38

BONNEROT C, HIVROZ C Signalisation et transport intra-cellulaire des immunorécepteurs *Médecine/sciences* 1999, **15** : 923-30

TESTER-VOUS

1 - Un lymphocyte mature exprime à sa surface des molécules capables de reconnaître l'antigène

A - appelées immunoglobulines de surface pour le lymphocyte B
B - appelées TCR pour le lymphocyte T
C - de spécificité antigénique multiple pour un lymphocyte donné
D - obtenues après mécanique recombinatoire génétique
E - acquises, au contact de l'antigène, dans les organes lymphoïdes primaires

2 - Le récepteur des lymphocytes B ou BCR:

A - comporte un dimère d'immunoglobuline
B - est étroitement associé au complexe CD3
C - est monospécifique
D - reconnaît l'antigène sous sa forme native (conformationnelle)
E - est absent sur le plasmocyte

3 - Le récepteur des lymphocytes T ou TCR:

A - est formé de deux chaînes polypeptidiques, le plus souvent 9:9, plus rarement 1:1
B - est étroitement associé au complexe CD79a/CD79b
C - est codé par les mêmes gènes que ceux des immunoglobulines
D - reconnaît le peptide antigénique présenté par les molécules HLA
E - existe sous forme soluble

4 - Les molécules de signalisation des immunorécepteurs sont :

A - CD79a pour le lymphocyte B et CD79b pour le lymphocyte T
B - CD79b pour le lymphocyte B et CD79a pour le lymphocyte T
C - CD79 pour le lymphocyte B et CD3 pour le lymphocyte T
D - porteuses de motifs ITAM
E - CD3 pour le lymphocyte B et CD79 pour le lymphocyte T

Dr. Gilles RENIER 2002

LE SYSTEME HLA

OBJECTIFS PRINCIPAUX :

- L'architecture fonctionnelle de ces molécules
- Le rôle respectif des classes I et II au travers des variations de leur structure, de leur synthèse et de leur distribution, et des cellules T qui les utilisent.
- L'organisation génétique et le polyallélisme

(Les passages en italiques ne sont là que pour information et pour aider à la compréhension)

INTRODUCTION :

On appelle "système HLA" (pour Human Leucocytes Antigens) le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de l'homme. Ce terme désigne un ensemble de gènes, étroitement liés sur un même chromosome (complexe), identifié initialement par ses effets majeurs dans le rejet des greffes (histocompatibilité). Ces gènes remarquablement conservés dans la phylogénie codent pour un panel de glycoprotéines qui jouent un rôle de "présentoirs" permettant la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T. Elles participent ainsi à la discrimination entre le "soi" et le "non-soi" et à la régulation de la réponse immunitaire. Ces molécules sont des hétérodimères constamment renouvelés à la surface des cellules qui peuvent être regroupés en 2 grandes familles différant par leur structure et, dans une certaine mesure, par leur rôle fonctionnel.

I - PLACE DU SYSTÈME HLA DANS LES DÉFENSES DE L'ORGANISME

Pour survivre, l'organisme doit être capable de préserver sa propre intégrité. Celle-ci est perpétuellement compromise parce que des cellules vont perdre leur capacité à remplir leur fonction physiologique (cancérisation mais aussi vieillissement) et parce qu'il sera confronté à un environnement hostile : micro-organismes divers cherchant à l'envahir, substances nocives, etc...

Pour faire face à ces menaces, l'organisme dispose d'abord de moyens de défense "non-spécifiques", intervenant immédiatement, sans chercher à identifier l'adversaire mais seulement à le détruire et à l'éliminer. Ce système de défense associe :
- des agents physico-chimiques tels que la sueur, l'acidité gastrique ou la kératinisation de la barrière cutanée,
- des molécules telles que l'interféron ou les composants de la cascade du complément,
- et enfin des cellules telles que les polynucléaires, pleinement fonctionnels dès leur passage dans le sang, ou les monocytes qui doivent franchir une étape supplémentaire de maturation pour devenir totalement opérationnels sous la forme de cellules macrophagiques dont les noms varieront en fonction de leur localisation tissulaire. Ces cellules se caractérisent par une double aptitude particulière à l'endocytose (phagocytose pour les éléments volumineux ou pinocytose pour les plus petits) et à la digestion les produits ingérés.

Sur cet ensemble de base, s'est développé chez les organismes dits supérieurs et en particulier les vertébrés, un système plus élaboré capable de produire une réponse beaucoup plus forte et qui devra donc également être étroitement contrôlée et focalisée avec une grande précision. Cette réaction sera spécifique de l'adversaire, adaptable à celui-ci et limitée. Son efficacité sera encore accrue lors d'une nouvelle rencontre ultérieure par une mémorisation du conflit permettant de déclencher une réponse plus précoce et plus intense.

Ce système repose sur un réseau de communications cellulaires articulées autour de la famille des lymphocytes et de leurs produits moléculaires (membranaires ou solubles : immunoglobulines, cytokines, etc.), mais aussi sur le contrôle que ce réseau va exercer sur les agents de l'immunité non-spécifique dont il va notamment pouvoir focaliser et amplifier l'action. Ce système qui représente l'immunité spécifique, va donc devoir reconnaître et identifier comme étranger ("antigène") tout ce qui n'appartient pas à l'organisme sain, choisir de s'activer et d'engager des moyens effecteurs chargés d'éliminer cet antigène mais qui seront ensuite muselés ou même détruits, et générer en parallèle les supports cellulaires de la mémoire immunologique.

La spécificité de la reconnaissance a été conditionnée par l'apparition de molécules capables d'identifier avec une grande précision un antigène bien déterminé : les récepteurs lymphocytaires pour l'antigène (immunoglobulines et "T Cell Receptor"). Les premières sont capables de reconnaître les antigènes entiers, intacts, dans leur état natif, et elles caractérisent une première famille de lymphocytes, les cellules B. Au contraire, le TCR (pour "T Cell Receptor") qui définit la famille des lymphocytes T, ne pourra "voir" l'antigène que s'il lui est préparé, modifié, présenté dans un environnement privilégié et informatif. Ce sont les glycoprotéines codées par le CMH qui jouent ce rôle de guide de la reconnaissance du TCR au travers de leur fonction de présentoirs aptes à lier un panel aussi large que possible de fragments d'antigène différents même si chacune d'entre elles n'en présente qu'un seul à la fois.

II - PHYLOGÉNIE : DE LA SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES AU SYSTEME HLA.

II - 1 - La "superfamille des immunoglobulines"

La "superfamille des immunoglobulines" (SFIg), qui inclue les molécules HLA, rassemble un large faisceau de molécules apparentées qui partagent certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles : leur portion extracellulaire reprend en effet en nombre variable et avec des modifications diverses une même sous-unité de base grossièrement semblable à un "domaine" d'immunoglobuline.

Cette sous-unité est constituée par une seule chaîne polypeptidique associant une centaine (70 à 110) d'acides aminés (AA) et repliée en 2 feuillets constitués respectivement de 3 et 4 segments bêta antiparallèles de 5 à 10 AA. L'ensemble est stabilisé par un pont disulfure agrafant une boucle de 50 à 70 AA. Les AA hydrophobes, rassemblés dans la partie interne, participent à la cohésion du domaine ; les AA hydrophiles, pointant à l'extérieur, assurent les éventuelles interactions moléculaires. Cette structure globulaire compacte a la propriété notable d'être peu sensible à la protéolyse.

Des événements successifs de duplications du gène primitif codant pour cette structure et de mutations ont conduit à l'apparition d'un faisceau de molécules reprenant en nombre variable des variantes plus ou moins divergentes du domaine ancestral. Ainsi s'est développée la SFIg dont les molécules ont pour rôle de médier des relations d'adhérence entre cellules par des interactions en règle intrafamiliales.

II - 2 - Les molécules du CMH et les récepteurs lymphocytaires pour l'antigène :

Les molécules de la SFIg ont été largement utilisées lors de la mise en place du système immunitaire. Celui-ci s'est en effet bâti autour d'une double particularité évolutive conditionnant la prise en charge directe de l'antigène :

- D'un côté, l'émergence des molécules du CMH avec leur relation privilégiée, quoique peu spécifique, avec les peptides (P dans le schéma ci-dessous) ; elles les protègent dès lors d'une dégradation complète. Cette nouvelle variété de glycoprotéines a ensuite poursuivi sa différenciation en se dédoublant en au moins 2 familles sœurs et en accompagnant de ses propres remaniements la succession des espèces jusqu'à donner, chez l'homme, l'état actuel du système HLA.

- De l'autre côté, l'acquisition de la capacité de reconnaître conjointement cette molécule modifiée et les peptides ainsi liés. Cette dernière aptitude a généré l'ancêtre des récepteurs lymphocytaires pour l'antigène, notamment celui des cellules T (le TCR). A l'extrême, la liaison s'est limitée au seul antigène et cette molécule a pu, dans une certaine mesure, s'affranchir du contexte cellulaire en donnant naissance aux Ig. Inversement, une autre voie évolutive a conduit à la persistance d'une liaison exclusive avec la molécule présentatrice ; elle caractérise les molécules CD8 (anciennement T8) et CD4 (ou T4) de ces mêmes lymphocytes T qui s'en serviront naturellement comme de co-récepteurs.

III - HISTOIRE ET NOMENCLATURE.

III - 1 - Développement du système HLA :

En 1952, Dausset, mélangeant un sérum de malade polytransfusé avec des leucocytes de moelle normale, a constaté l'apparition d'agglutinats traduisant la présence d'un alloanticorps. La poursuite de cette étude a conduit en 1958 à l'identification de la première spécificité "MAC". Depuis 1964 des ateliers de travail internationaux ("workshop") réunis régulièrement ont beaucoup accéléré la connaissance du système HLA.

Les méthodes sérologiques, utilisant des anticorps spécifiques, ont permis de reconnaître 1, puis 2, puis 3 séries de molécules correspondant à 3 locus chromosomiques voisins notés HLA-A, HLA-B et HLA-C. Leur ensemble constitue la première famille de molécules HLA, appelée HLA de classe I.

D'autre part, les techniques de cultures cellulaires, par l'analyse de "réactions mixtes lymphocytaires" (RML), ont conduit à l'individualisation d'un quatrième locus, HLA-Dw, dont la contrepartie sérologique a été appelée HLA-DR (pour "D related"). Cette dernière région correspond au HLA dit de classe II. Elle a été démembrée depuis 1980 en trois sous-régions nommées HLA-DP *(issue de l'analyse des RML secondaires)*, HLA-DQ *(individualisée à partir des données sérologiques)* et HLA-DR.

Les deux groupes de trois locus ainsi définis correspondaient donc à deux familles de molécules HLA baptisées respectivement molécules HLA de classe I et de classe II et on s'est bientôt aperçu qu'au niveau de chacun de ces locus existaient de très nombreux allèles, c'est à dire des formes variantes du même gène, et que ces allèles sont exprimés dès lors qu'ils sont présents (ils sont donc dits "codominants").

Les progrès dans la connaissance du HLA ont ensuite grandement bénéficié de l'apport de nouvelles techniques biochimiques (migrations des molécules selon leur poids moléculaire et/ou leur point isoélectrique, en 1 ou 2 dimensions ...) et de la génétique moléculaire (enzymes de restriction et hybridation par des "sondes" nucléiques ...). Les techniques de diffraction aux rayons X d'un cristal de protéine ont enfin permis de connaître la conformation spatiale d'une molécule de classe I (HLA-A2 ; cristal de protéine obtenu à partir de 200 litres de culture de cellules lymphoblastoïdes humaines) en 1987 puis de classe II (HLA-DR1) en 1993.

III - 2 - Nomenclature :

La nomenclature internationale désigne chaque molécule HLA par la lettre indiquant le locus où elle est codée, suivie d'un nombre qui lui est propre (par exemple HLA-B27) ; *ce nombre correspond au numéro d'ordre de découverte de l'allèle.* Pour le locus C on utilise le code Cw (ex : Cw1) afin d'éviter toute confusion avec les composants du complément.

Un statut transitoire était en outre signalé jusqu'à ces dernières années par l'addition d'un "w" également (ex : Bw72) ; ceci n'est plus conservé que pour des cas bien précis tels que les spécificités HLA-Bw4 et Bw6.

D'autre part, la nomenclature actuelle distingue entre la spécificité immunologique reconnue habituellement par la sérologie (suffisante en pratique quotidienne) et qui conserve la notation précédente (ex : HLA-B27), et les allèles définis par leur séquence nucléotidique, dont plusieurs peuvent parfois correspondre à une seule et même spécificité moléculaire. Dans cette nouvelle désignation des allèles, le nombre est de 4 chiffres et il est précédé d'un astérisque et du nom du gène lui-même (ex : HLA-B*2705).

IV - ORGANISATION GENETIQUE

IV - 1 - Localisation chromosomique :

Par l'étude de diverses familles porteuses d'anomalies chromosomiques, le complexe HLA a été localisé dans la bande p.21 du bras court du chromosome 6 (plus précisément 6p21.3). L'analyse de recombinaisons chromosomiques familiales a permis d'évaluer les distances entre les divers locus (exprimées alors en centimorgans qui équivalent en fait grossièrement à 1000 kilobases) et les méthodes d'hybridation moléculaire de préciser la localisation de certains gènes (ex : 21 hydroxylase) dans cette région.

IV - 2 - Cartographie :

A partir du centromère sont successivement rencontrés sur le bras court du chromosome 6 :

- La région HLA de classe II *étagée sur 1,5 centimorgans (cmg*) avec dans l'ordre les sous-régions DP, DQ et DR renfermant chacune des gènes appartenant à deux familles complémentaires (notées alpha et bêta) dont les produits s'associeront pour former des hétérodimères alpha-bêta.
- Une région intermédiaire *de 0,7 cmg* qui renferme des gènes parfois abusivement qualifiés de classe III mais qui n'ont en réalité aucune parenté avec le système HLA : ils codent pour la 21-hydroxylase intervenant dans la synthèse des hormones surrénaliennes (2 gènes dont un seul, 21OHB, fonctionnel), certains composants du complément (C4B, C4A, Bf et C2), certains membres de la famille des "Heat Shock Protein", ou encore les "Tumor Necrosis Factor" (TNF).
- La région HLA de classe I étagée *sur 1 cmg (0,8 + 0,2)* avec dans l'ordre les locus B, C et A chacun constitué d'une seule famille de gènes (notée alpha).

Cette présentation schématique est cependant loin de refléter la complexité de la réalité : en 1992, 86 gènes, pseudogènes ou fragments de gènes avaient ainsi été répertoriés au sein de ce segment chromosomique d'environ 3600 kilobases.

Tout d'abord, chacune des sous-régions DP, DQ et DR contient un seul gène alpha et un seul gène bêta fonctionnels, sauf la sous-région DR qui peut héberger deux ou trois gènes bêta fonctionnels ce qui signifie qu'à partir des deux chromosomes 6, plus de six hétérodimères pourront être formés.

Cette diversité est même en réalité encore plus grande puisque le produit du gène alpha d'une sous-région DP, DQ ou DR d'un chromosome peut s'associer avec le produit du gène bêta de la sous-région correspondante de l'autre chromosome ou même parfois avec le produit du gène bêta d'une autre sous-région DP, DQ ou DR.

Ensuite, au cœur de la région HLA de classe II, entre DP et DQ, ont été individualisés des gènes dont les produits interviendraient dans la synthèse des molécules HLA et la préparation des peptides présentés :

- TAP 1 et TAP 2 ("Transporter of Antigen Peptides" ou "Transporter associated with Antigen Processing"),
- LMP 2 et LMP 7 ("Large Multifunctional Protease" ou "Low Molecular weight Protease"),
- HLA-DMA et HLA-DMB

Enfin, de nombreux gènes apparentés aux gènes HLA de classe I (HLA-E, F, G, H, etc..) ou de classe II (HLA-DMA et HLA-DMB déjà cités,...) mais distincts de ceux-ci, ont également été décrits. La plupart sont localisés au sein du CMH ou dans la région qui le prolonge *sur environ 11 cmg* du côté des gènes de classe I. Moins bien connus, ils ne présentent pas le même polymorphisme que les gènes HLA "classiques" et leur expression est en règle beaucoup plus limitée. La fonction de leur produit parait également beaucoup plus spécialisée.

HLA-G est ainsi exprimée au niveau des cellules trophoblastiques qui bordent l'interface materno-foetal dans la grossesse et on lui attribue un rôle régulateur dans les phénomènes immunologiques qui s'y déroulent.

Une partie au moins de ces gènes non-classiques, le groupe des molécules CD1 codées sur le chromosome 1, constitue en réalité une autre famille moléculaire apparentée aux deux premières, remplissant la même fonction de présentoir mais pour des antigènes lipidiques et non protéiques.

IV - 3 - Caractères Principaux:

Les gènes HLA de classe I et de classe II sont codominants (toujours exprimés quand ils sont présents). Ils sont polyalléliques, chaque locus comportant de nombreux allèles *(41 allèles HLA-A, 71 HLA-B, 19 HLA-Cw et plus de 70 HLA-DR).* Ceci entraîne un polymorphisme considérable (plusieurs 10^{10} possibilités) qui fait du système HLA un marqueur génétique extrêmement puissant. Il est quasi impossible de trouver deux sujets identiques. La comparaison des spécificités fait apparaître de très nombreuses réactions croisées, particulièrement pour les allèles de classe I, à l'intérieur d'une même série allélique (ex : A2, A28 et A9) ou parfois interlocus (ex : A9 et B27). *Il existe ainsi des spécificités "privées" et "publiques" (ex : tous les allèles du locus B sont aussi Bw4 ou Bw6).* Certains allèles sont plus fréquents dans certaines populations ; cependant la fréquence des allèles les plus représentés dépasse rarement 20%.

IV - 4 - Transmission :

L'ensemble des gènes HLA d'un même chromosome (haplotype) est transmis en bloc ; les recombinaisons sont rares (= ou < 1 % entre B et D ou B et A). Il existe des déséquilibres de liaison (associations plus fréquentes que ne le voudrait le hasard) entre certains gènes (ex : A1 B8 = 8 % au lieu de 1 %), particulièrement ceux de classe II.

Les déséquilibres de liaison pourraient être dus à des reliquats d'associations issues de patrimoines ancestraux. On a ainsi pu proposer en Europe un schéma associant 2 migrations (venues de l'est et du nord) et 4 isolats résiduels.

V - STRUCTURE DES MOLÉCULES HLA :

V - 1 - Architecture générale des molécules HLA :

Les gènes du complexe HLA codent pour des hétérodimères glycoprotéiques de membrane qui partagent tous une même architecture au niveau de leur partie extra-cellulaire. Celle-ci est formée de 4 domaines globulaires de 90 AA environ appariés 2 à 2. L'un des 2 domaines les plus éloignés de la membrane cellulaire a la particularité d'être dépourvu de pont S-S ; il est toujours noté $\alpha 1$.

Les 2 domaines proximaux ont une grande homologie avec le domaine constant CH3 des Ig et justifient ainsi à eux seuls l'intégration de ces molécules dans la SFIg. Ils séparent de la membrane cellulaire les 2 domaines externes qui sont fusionnés dans une structure très particulière.

L'extrémité distale d'une molécule HLA (schéma ci-dessous) se présente en effet comme un plateau de 8 segments bêta antiparallèles sur lequel reposent 2 hélices alpha. La plupart des AA variant d'un allèle à l'autre et de ceux qui sont critiques pour la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T sont situés sur le plancher ou les parois de la gorge ainsi

délimitée, ou parfois sur la face externe des hélices alpha. Cette cavité unique et médiane est occupée par un matériel variable qui correspond au fragment d'antigène, en général un peptide, présenté par la molécule. Une variation d'un seul AA de cette cavité peut en modifier complètement les propriétés de liaison de ces peptides.

V - 2 - Les molécules de classe I :

Une seule chaîne de l'hétérodimère, notée α, est codée dans la région HLA. Elle englobe trois des quatre domaines extracellulaires et la portion transmembranaire puis intracytoplasmique de la molécule. Ses deux premiers domaines N-terminaux forment le site de liaison du peptide et elle supporte seule tout le polymorphisme de la molécule. Cette chaîne α est associée de façon non covalente à une autre chaîne protéique, la β2-microglobuline, monomorphe, totalement extracellulaire et beaucoup moins volumineuse.

V - 2 - l - La chaîne α :

D'un poids moléculaire de 45 000 daltons (D), elle est composée de 340 acides aminés et comporte 3 parties :
- extra-cellulaire formée de 3 domaines globulaires de 90 AA environ notés successivement α1, α2 et α3. Les 2 plus externes α1 et α2 incluent chacun une région de variabilité de la molécule et α1 ne présente pas de pont disulfure.
- transmembranaire, hydrophobe, de 20 AA.
- intracytoplasmique, carboxyle terminale, de 30 à 40 AA, *très hydrophile et phosphorylable ce qui pourrait traduire un rôle dans les interactions avec les protéines du cytosquelette.*

V - 2 - 2 - La β2-microglobuline:

D'un PM de 12 000 D, elle est codée par un gène du chromosome 15. Elle est totalement extracellulaire et s'associe de façon non covalente au niveau du domaine α3. Un seul domaine, renfermant un pont S-S, la compose et une grande homologie (80 %) existe entre les séquences de différentes espèces. Bien que non polymorphe, c'est un composant essentiel de la molécule nécessaire à sa stabilité et à son expression à la surface cellulaire.

Synthétisée en excès, elle est sécrétée dans de nombreux liquides biologiques (urine). Elle sert de marqueur tumoral dans le myélome.

V - 2 - 3 - Les sites de liaison :

Les deux premiers domaines N-terminaux $\alpha 1$ et $\alpha 2$ porteurs de tout le polymorphisme de la molécule forment le site de liaison du peptide dont la structure a été particulièrement bien étudiée. Il se présente comme une fente refermée à ses deux bouts par l'interaction des chaînes latérales des acides aminés situés aux extrémités des 2 hélices alpha et du plancher bêta ; la longueur des peptides pouvant être incorporés se trouve ainsi limitée à 9 ou 10 AA.

Cette cavité peut s'insinuer sous les hélices alpha pour former, selon les allèles, six prolongements secondaires notés de A à F et dans lesquels les peptides liés peuvent (ou non) insérer et amarrer une chaîne latérale.

Le domaine $\alpha 3$ porte le lieu d'ancrage du corécepteur CD8 (cf. infra).

V - 3 - Les molécules de classe II :

Les molécules de classe II sont formées de deux chaînes glycoprotéiques α (PM : 33 000 d) et β (PM : 28 000 d) codées chacune par l'une des 2 familles de gènes présentes dans la région HLA classe II. Chaque chaîne se compose de 2 domaines ($\alpha 1$ et $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$) extracellulaires, d'un segment transmembranaire et d'une partie intracytoplasmique. Parmi ces 4 domaines, seul $\alpha 1$ ne présente pas de pont S-S *et comporte 85 AA (95 AA pour les autres).*

Sauf pour les molécules DQ, le polymorphisme est porté essentiellement par la chaîne β.

Le site de liaison des peptides est formé par l'association des 2 domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ et est donc partagé par les 2 chaînes constitutives de la molécule HLA de classe II. *Le domaine $\beta 2$ comporte pour sa part le site de liaison du corécepteur CD4.*

La cristallisation d'une molécule HLA de classe II a mis en évidence deux différences principales par rapport aux molécules de classe I :

- Le cristal était composé d'un doublet de cette molécule

- La cavité où sont présentés les peptides est ouverte à ses deux extrémités et ces derniers pourront donc en déborder.

VI - UNE MEME FONCTION : PRESENTOIR DE PEPTIDES.

Les molécules HLA jouent un rôle de "présentoirs" d'antigènes intervenant dans les communications entre les cellules immunocompétentes en particulier au niveau des lymphocytes T.

VI - 1 - La présentation des peptides :

L'extrémité distale d'une molécule HLA (schéma 3) se présente comme une fente unique et médiane, délimitée par un plateau de 8 segments bêta antiparallèles sur lequel reposent 2 hélices alpha. Cette cavité constitue le site, unique, de liaison de l'antigène. Elle permet la fixation compétitive, lente mais stable, d'une très grande variété de peptides reposant dans des positions diverses (comme un lit à une place dans lequel on pourrait se coucher de différentes façons).

L'antigène n'est en effet pas présenté à l'état brut mais il est préalablement "traité", clivé en peptides. Ceux-ci peuvent en réalité être issus du "Soi" ou étrangers et certains d'entre eux seulement seront liés et possiblement reconnus. Leur liaison et donc leur présentation est conditionnée par la forme de la cavité avec ses éventuels prolongements sous les hélices alpha, et par la nature des AA qui la bordent.

La compréhension des conditions régissant l'incorporation de ces peptides dans une molécule HLA constitue un enjeu important pour l'immunomodulation. Certains paramètres apparaissent aujourd'hui assez bien établis en ce qui concerne les molécules HLA de classe I avec la mise en évidence de points d'ancrage majeurs au niveau des prolongements F (AA hydrophobe ou aromatique) et B (deuxième ou troisième AA du peptide) qui vont définir une certaine spécificité de la liaison.

VI - 2 - Le phénomène de restriction :

Zinkernagel et Doherty (prix Nobel 1996) ont observé qu'un lymphocyte T cytotoxique ne tue un fibroblaste infecté par un virus que s'il reconnaît sur cette cellule à la fois la marque du virus et sa propre identité représentée ici par une molécule HLA de classe I. Cet exemple illustre l'expression des conditions de reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T.

Par l'intermédiaire de leur TCR, les lymphocytes T reconnaissent en effet de façon spécifique l'ensemble constitué par le peptide enchâssé entre les 2 hélices alpha d'une molécule HLA. Ce contact semble de faible affinité et la liaison des corécepteurs CD4 ou CD8 sur la molécule HLA au niveau des domaines $\beta 2$ et $\alpha 3$ respectivement permet de conforter cette reconnaissance. Pour être immunogène dans ce contexte, un peptide devra donc d'une part être capable de se fixer sur une molécule HLA et d'autre part être reconnu par le récepteur pour l'antigène (TCR) d'un lymphocyte T.

VI - 3 - Conséquences sur le répertoire T :

Les propres peptides de l'individu sont en compétition avec ceux issus des antigènes pour former des complexes avec les molécules HLA mais ils ne doivent donner lieu à aucune reconnaissance antigénique.

Ceci suppose que les molécules HLA, associées à des peptides du Soi, interviennent directement dans la constitution du répertoire des lymphocytes T au cours de leur maturation intrathymique. Elles vont modeler ce répertoire à la mesure de l'individu en sélectionnant les seuls clones dont le TCR est capable d'interagir avec elles ("restriction HLA") d'une façon moyenne, ni trop faible ni trop forte, et en supprimant les clones autoréactifs. De plus, elles participent au choix de celui des 2 corécepteurs CD4 et CD8 qui correspond à la spécificité du TCR sélectionné. Après éducation des lymphocytes T dans le thymus, 2 populations cellulaires principales sont ainsi obtenues : l'une ne reconnaît l'antigène que dans le contexte des molécules de classe I et se caractérise par la présence du corécepteur CD8, l'autre est "restreinte" par les molécules de classe II et porteuse du corécepteur CD4.

VI - 4 - Le polymorphisme et l'alloréactivité - Rôle en histocompatibilité :

La multiplication des locus (polygénisme) dans chacune des deux familles du CMH (HLA A, B et C pour la classe I ; DP, DQ et DR pour la classe II) et l'apparition d'un polyallélisme au niveau de chacun de ces locus a généré un double polymorphisme. Celui-ci est concentré au niveau du site de liaison des peptides ; une modification, même minime, pourra donc modifier la présentation antigénique de façon importante. Cette variabilité pourra se traduire alors au niveau de l'individu par une susceptibilité (ou une résistance) personnelle particulière vis à vis de certaines affections.

Cette variabilité individuelle est aussi responsable des phénomènes d'alloréactivité. C'est le rôle fondamental (comme celui des groupes sanguins ABO en transfusion) bien que totalement artificiel et extraphysiologique qui a permis la découverte du système HLA. La greffe apportant à l'organisme un nouveau jeu de molécules HLA et de nouveaux peptides

issus du Soi, tout se passe alors comme si le système immunitaire de l'individu X reconnaissait les antigènes HLA de Y comme s'il s'agissait de ses propres molécules HLA X porteuses d'antigènes d'un virus Z selon une sorte d'équation HLA Y = HLA X + Virus Z. S'il s'agit de HLA de classe II, la réaction se traduit par une prolifération ; c'est ce qui est mis à profit in vitro dans la RML.

VII - DES ROLES PARALLELES

Pour une cellule donnée, l'antigène ne peut être qu'endogène, synthétisé par la cellule elle-même et reflétant son état propre, ou exogène, capté par la cellule dans le milieu extérieur et indiquant l'état de son environnement. Dans le premier cas il sera pris en charge par les molécules de classe I, dans le second par celles de classe II.

Les deux familles de molécules HLA exercent donc une même fonction de présentoirs mais les fragments d'antigènes qu'ils prennent en charge n'ont pas la même origine ni la même signification et leurs rôles sont donc parallèles et complémentaires. Cette dichotomie fonctionnelle résulte d'une synthèse et d'une distribution différentes (schéma ci-dessous et tableau récapitulatif).

VII - 1 - Les molécules de classe I:

VII - 1 - 1 - Synthèse :

La chaîne alpha, seule codée dans le CMH, est synthétisée dans le réticulum endoplasmique où elle va s'associer avec d'une part la bêta-2-microglobuline synthétisée en excès et d'autre part l'un des peptides présents dans ce compartiment cellulaire. Ces deux associations s'accompagnent de modifications conformationnelles et sont toutes les deux indispensables à la stabilité de l'ensemble et à son expression membranaire.

Les peptides présentés doivent être présents dans le réticulum endoplasmique. Ils proviennent donc :
- soit de molécules synthétisées dans ce compartiment,
- soit de molécules synthétisées et dégradées dans le cytosol et ils auront alors été transportés dans le réticulum endoplasmique.

Parmi les voies de dégradation intracytoplasmique des protéines ou de transfert des peptides celles qui font intervenir les gènes LMP et TAP découverts au sein du CMH approvisionneraient les molécules naissantes en peptides adaptés.

Les produits des gènes lmp-2 et lmp-7 constituent en effet deux des 20 à 30 sous-unités d'un complexe multicatalytique (LMP ou "protéasome"). Ils permettraient la production de peptides ayant une extrémité C-terminale particulièrement adaptée pour interagir avec la poche F du site de présentation peptidique.
Les gènes Tap-1 et Tap-2 codent pour des protéines comportant six à huit segments transmembranaires et ayant une grande homologie avec des transporteurs membranaires possédant une région dite ABC ("ATP Binding Cassette") et donc dépendants de l'ATP. Elles constituent les deux sous-unités d'un transporteur membranaire qui assurerait le transit des peptides produits par le protéasome LMP en sélectionnant peut-être préférentiellement ceux dont la longueur (9 acides aminés) est bien adaptée aux dimensions de la cavité des molécules HLA de classe I. Celle-ci étant fermée à ses extrémités, des peptides d'une longueur supérieure, liés par leurs deux bouts, vont bomber hors de la cavité et seront donc moins bien arrimés.

VII - 1 - 2 - Distribution :

Les molécules HLA de classe I sont ubiquitaires, présentes sur à peu près toutes les cellules et tous les tissus de l'organisme. Leur expression est faible voire nulle sur les hématies humaines anucléés. Des formes solubles peuvent être retrouvées dans les liquides biologiques.

VII - 2 - Molécules de classe II:

VII - 2 - 1 - Synthèse :

Les chaînes alpha et bêta codées dans le CMH, sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique où elles sont rapidement associées entre elles pour former un dimère αβ puis à la chaîne invariante (Ii *ou CD74*) présente en grand excès dans ce compartiment cellulaire.

Cette dernière est une glycoprotéine de 31 kDa transmembranaire dont l'extrémité C-terminale est intra-luminale et l'extrémité N-terminale intra-cytoplasmique (glycoprotéine de type II), et dont le gène est situé sur le chromosome 5.

Extrêmement conservée au cours de l'évolution, elle évite l'agrégation par mal-repliement des molécules HLA de classe II (rôle de molécule chaperon), empêche la fixation de peptides dans le site de présentation et, grâce à des signaux localisés dans sa partie cytoplasmique, contrôle le transport du trimère αβIi. Contrairement aux molécules de classe I qui apparaissent à la surface cellulaire en 30 minutes, les molécules de classe II vont avoir un délai d'expression à la membrane de 2 à 4 heures. Ceci résulte du fait qu'elles vont aller au préalable rejoindre la voie d'endocytose où elles seront débarrassées de la chaîne invariante et chargées en peptide.

La voie d'endocytose comprend plusieurs compartiments plus ou moins successifs que l'on peut schématiquement classer en vésicules d'endocytose, endosomes précoces puis tardifs, vésicules de recyclage, et enfin lysosomes (où le pH est le plus acide et les protéases les plus actives). Les molécules HLA de classe II sont particulièrement représentées dans un sous-compartiment particulier de cet ensemble *qui a été appelé MIIC (MHC class II Compartment) ou CIIV (vésicules de classe II) et* qui fourni un environnement mieux adapté à la liaison des peptides antigéniques. Dans ce compartiment la chaîne invariante va être dégradée par les protéases auxquelles elle est très sensible (à l'inverse des molécules HLA). Le dimère αβ va être ensuite libéré de son association avec le fragment CLIP ("Class II associated Invariant Peptide" issu de la dégradation de Ii) qui bloque (directement ou indirectement) l'accessibilité au site de présentation des peptides et il pourra donc s'unir à l'un des peptides présents dans ce compartiment cellulaire. La molécule de classe II mature ainsi formée n'est plus prisonnière des signaux de rétention présents dans la chaîne invariante et pourra rejoindre la membrane cellulaire.

Une fois arrivées à la surface, des phénomènes de recyclage pourraient permettre à une partie des molécules HLA de classe II de présenter plusieurs peptides successifs.

Les produits des gènes HLA-DMA et HLA-DMB s'assemblent pour former un hétérodimère, HLA-DM, de structure semblable à celle des molécules HLA de classe II classique, et qui joue un rôle primordial dans l'association entre peptides et dimères αβ. HLA-DM pourrait servir de navette livrant les peptides présentables ou de molécule chaperon facilitant leur fixation, mais sa fonction la plus probable serait la capture des produits de dégradation de la chaîne invariante et en particulier du peptide CLIP (en libérant l'accessibilité au site de présentation de la molécule HLA en cours de préparation).

VII - 2 - 2 - Distribution :

Certaines cellules sont mieux équipées pour présenter des peptides antigéniques de cette façon : Les unes parce qu'elles sont particulièrement douées pour la phagocytose (macrophages...), les autres (lymphocytes B) parce qu'elles sont dotées d'un récepteur spécifique (Ig membranaire) qui leur permet de sélectionner un antigène précis et donc de présenter un jeu limité de peptides.

L'expression des molécules HLA de classe II est donc restreinte aux cellules impliquées dans la réponse immunitaire :

- Cellules Présentant l'Antigène (CPA) : cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B.
- lymphocytes T lorsqu'ils sont activés.

VII - 3 - Rôles respectifs des molécules de classe I et de classe II.

VII - 3 – 1 : Dichotomies "en miroir" de la prise en charge des peptides par HLA et des lymphocytes T ; les rôles respectifs des molécules de classe I et de classe II :

Les molécules HLA exercent leur fonction commune de "présentoirs" d'antigènes de façon parallèle :

- Les molécules de classe I sont relativement ubiquitaires, présentes avec une abondance variable sur la plupart des cellules et tissus de l'organisme. Elles incorporent des peptides présents dans le cytoplasme de la cellule c'est-à-dire le plus souvent synthétisés par la cellule elle-même. Le rôle de cette famille de molécules HLA est donc de présenter à la surface de la cellule le reflet de son état propre : saine ou malade.
- Les molécules de classe II ont une expression limitée aux cellules impliquées dans une réponse immunitaire. Elles présentent l'antigène s'il se trouve dans un endosome, c'est à dire en général s'il a été capté par la cellule dans le milieu extérieur. Le rôle de cette famille de molécules HLA est donc de présenter à la surface de la cellule le reflet de l'état "sanitaire" de son environnement.

Les lymphocytes T ne reconnaissent l'antigène par leur TCR que sous la forme d'un peptide incorporé dans une molécule HLA bien précise (et pas une autre). Après activation, ils expriment alors chacun leur activité fonctionnelle propre. Et comme il existe deux grandes classes de molécules HLA les lymphocytes T vont se répartir en deux sous-familles principales :

- les uns, portant le corécepteur CD8, ne reconnaissent l'antigène que présenté par une molécule HLA de classe I et donc reflétant l'état de la cellule elle-même ; ils vont donc pouvoir décider de sa survie et sont le plus souvent doués de cytotoxicité
- les autres sont "restreints" par les molécules de classe II et expriment la glycoprotéine CD4. Ils perçoivent ainsi une information sur l'état général de l'environnement de la cellule et pourront donc décider s'il y a lieu ou non de déclencher une réponse coordonnée des acteurs du système immunitaire ; ce qu'ils feront notamment en délivrant des signaux activateurs tels que la production de lymphokines (fonction "auxiliaire" ou "helper").

VII - 3 – 2 : modèle d'une infection virale (schéma ci-dessous) :

Lors d'un conflit immunologique, le système immunitaire se mettra en route (lymphocyte T CD4+ "helper") grâce à la reconnaissance de l'antigène dans le contexte du HLA de classe II. Son action s'effectuera par la mise en œuvre des divers agents effecteurs de la réponse immunitaire dont les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques qui assureront la destruction des cellules cibles lesquelles présentent à leur surface un peptide reconnu étranger, enchâssé dans une molécule de classe I.

Dans d'une infection virale par exemple, les molécules HLA vont ainsi pouvoir intervenir schématiquement à deux niveaux.

Le virus ne peut se reproduire qu'en détournant à son profit la machinerie d'une cellule hôte. Celle-ci synthétise alors en masse les différents composants du virus (acide nucléique, protéines d'enveloppement, de la nucléocapside ...) qui s'assemblent en de nouveaux virus. Cependant certains d'entre eux seront mis en forme et fixés sur des molécules HLA de classe I. D'autres seront relargués dans la circulation générale par exemple à la suite d'une lyse cellulaire. Ils seront intériorisés (phagocytose ...) par d'autres cellules, notamment par les cellules présentatrices d'antigène qui les présenteront sur des molécules de classe II.

Le système immunitaire se mettra en route (lymphocyte T "helper") grâce à la reconnaissance de l'antigène dans le contexte du HLA de classe II (dont la distribution est limitée aux cellules immunocompétentes engagées dans la réaction immunitaire en cours). Son action va s'effectuer par la destruction (lymphocytes T cytotoxiques) des cellules infectées par le virus (qui présentent à leur surface de l'Ag dans le contexte du HLA de classe I) ce qui, en interrompant son cycle, stoppe l'infection virale. Ceci n'exclue pas la mise en œuvre des autres acteurs de la réponse immunitaire (anticorps notamment).

Le grand polymorphisme observé parmi les molécules d'une même classe pourrait avoir pour fonction d'assurer une meilleure protection de l'espèce en augmentant la probabilité d'avoir toujours des individus "répondeurs" (donc résistants) dans une population quel que soit le virus en cause. L'importance de ce polymorphisme est souligné par son ancienneté dans l'évolution, son apparition ayant précédé la spéciation, homme chimpanzé par exemple.

VII - 3 – 3 : Actions corollaires des molécules HLA :

Des détournements du rôle joué par chaque classe de molécule HLA ont doté chacune d'une action corollaire particulière pouvant avoir des conséquences en pathologie.

Les molécules de classe I présentant un reflet de l'état de la cellule qui les porte, un moyen pour cette dernière (cancéreuse ou infectée) d'échapper à l'action des lymphocytes T cytotoxiques consiste en une disparition de l'expression de ces molécules. Pour combattre ce mode d'échappement, une variété particulière de lymphocytes dits NK (pour "natural killer") vérifie la présence des molécules de classe I à la surface des cellules rencontrées et les tue en cas d'absence. Les molécules de classe I reconnues par un jeu de récepteurs particuliers délivrent ce faisant un signal inhibant l'action cytotoxique de ces cellules NK.

Les molécules de classe II jouent un rôle dans l'activation du système immunitaire. Certains germes produisent des substances capables de relier une molécule HLA de cette classe à des familles entières de TCR, indépendamment de toute reconnaissance antigénique. Ces "superantigènes" provoquent ainsi une réaction excessivement forte et potentiellement mortelle.

VII - 4 - Les molécules CD1, présentoirs du troisième type :

Les molécules CD1, codées sur le chromosome 1, constituent une autre famille moléculaire apparentée aux deux précédentes. Leur structure est comparable à celle des molécules de classe I avec une chaîne alpha associée à la bêta-2-microglobuline mais elles ne présentent pas ou peu de polyallélisme et leur site de présentation antigénique est très

particulier. Le réceptacle destiné à lier le fragment antigénique est en effet constitué d'une poche profonde, dépourvue de multiples prolongements latéraux, s'ouvrant en une fente très étroite et, surtout, bordée d'AA hydrophobes ou non polaires. Il s'ensuit que ces molécules CD1 sont aptes à présenter des fragments comportant un pôle hydrophile, qui pointera vers l'extérieur, et un pôle hydrophobe qui sera enfoui dans la poche, et notamment divers composants lipidiques ou glycolipidiques des enveloppes bactériennes.

Ce type de présentation sera reconnue par des lymphocytes T particuliers.

VIII - HLA ET MALADIES

VIII - 1 - Syndrome du lymphocyte "nu" :

Exceptionnel (environ 30 cas répertoriés), il se caractérise par un défaut d'expression des molécules HLA de classe I et/ou II à la surface des cellules. Ceci se traduit par un déficit immunitaire combiné (B et T), précoce et mortel dans les premières années de vie.

VIII - 2 - Maladies liées à l'HLA :

Le gène responsable se situe dans la région HLA. L'étude porte sur les familles et permet de déduire le sort de la parenté d'un malade.

- Hyperplasie congénitale des surrénales liée à un déficit en 21 hydroxylase (récessif) dont les 2 gènes sont présents dans la région HLA "classe III".

  Forme grave : délétion du gène 2lOHB et de son voisin C4B ; liée à B47.
  Forme tardive : C4B reste présent ; liée à B14.

- Hémochromatose idiopathique (récessif) : gène proche de A ; association préférentielle à A3 ;

le gène en cause (HFE), proche de HLA-A, correspondrait à HLA-H qui code pour une molécule ressemblant à celles de classe I mais ayant la particularité de posséder une poche de présentation complètement refermée et non fonctionnelle, et interagissant avec le récepteur pour la transferrine.

- Déficit en C2 ou en C4 : symptomatologie autoimmune (type lupus)

VIII - 3 - Maladies associées à HLA :

Il n'y a plus un gène responsable situé à proximité des locus HLA ni de famille informative mais des cas isolés. On compare la fréquence des divers allèles parmi les malades et parmi les témoins, d'où calcul d'un Risque Relatif (ou inversement d'une "Fraction Protectrice"). Plusieurs facteurs interviennent dont le HLA, parfois au premier plan :

- narcolepsie : 100 % des sujets sont DR2

- spondylarthrite ankylosante : 90 % sont HLA-B27, RR = 90 % (mais seule une faible minorité des individus HLA B27 aura une spondylarthrite ankylosante).

L'existence d'une poche secondaire limitée par les AA 45 et 67 serait à l'origine de l'implication de HLA-B27 dans la prédisposition à la spondylarthrite ankylosante.

VIII - 4 - HLA et transferts cellulaires :

Leur statut de présentoirs d'antigènes aux lymphocytes T au niveau de la phase initiatrice de la réponse immunitaire (classe II) ou au niveau de sa phase effectrice cellulaire (classe I) fait de ces molécules un paramètre clef du devenir des cellules d'un donneur chez un receveur. La recherche d'une "compatibilité" HLA (identité aussi parfaite que possible) est donc primordiale dans tout ce qui est transplantation de cellules hématopoïétiques ou d'organes, ou bien transfusion massive de plaquettes.

IX - PRINCIPALES MÉTHODES D'ÉTUDE :

IX - 1 - La sérologie = la microlymphocytotoxicité (Terasaki - 1964) :

IX - 1 - 1 - Principe :

C'est l'étude de la lyse des lymphocytes du sujet à typer par des anticorps de spécificité connue en présence de complément (schéma 7).

IX - 1 - 2 - Méthodologie :

- 10 ml de sang prélevés sur héparine + 10 cc de PBS
- séparation des cellules par sédimentation sur Ficoll, récupération à l'interface, lavages, ajustage à 3000 L/mm3
- répartition en plaques de Terasaki (1µ1/puits) préparées à l'avance avec toute une batterie d'antisérums connus, y compris les témoins + et - ; incubation (1/2 heure à 25°C)
- adjonction du complément ; incubation (lh30 à 25°C)
- coloration par éosine (révèle les cellules tuées) + formol
- lecture au microscope inversé

IX - 1 - 3 - Interprétation :

On ne tient compte que des réactions massives (++++ = 100 % de lyse ou +++ = 75 %) et obtenues avec plusieurs antisérums.

IX - 1 - 4 - Méthodes dérivées :

- cross-match : sérum du receveur + cellules du donneur (une lyse faible compte),
- recherche d'anticorps : sérum du malade + un panel de cellules déjà typées.

IX - 2 - Les techniques cellulaires : la RML

IX - 2 - 1 - Principe :

C'est l'étude de la prolifération, mesurée généralement par l'incorporation de thymine traitée radioactive, de cellules répondeuses (lymphocytes T du malade) au contact de cellules stimulantes (lymphocytes B homozygotes vivants mais bloqués par la mitomycine et ne pouvant donc plus proliférer) de phénotypes connus.

IX - 2 - 2 - Méthodologie :

- 50 000 L répondeurs (A) + 50 000 L stimulants (B)
- culture 5 jours à 37°C sous C02 - addition de thymine radioactive puis arrêt par refroidissement
- comptage (cp/mn) ; calcul de la réponse relative :

$$RR = \frac{\text{réponse du sujet - réponse du témoin (-)}}{\text{réponse du témoin (-)}}$$

réponse du témoin (+) - réponse du témoin (-)

IX - 2 - 3 - Interprétation:

Identité si RR < 30 % Incompatibilité complète si RR > 70 %

IX - 2 - 4 - Corollaires :

CML = génération de cellules cytotoxiques
PLT = RML IIaire avec des cellules présensibilisées ("primées") ; a permis l'individualisation du locus DP.

IX - 3 Les techniques de biologie moléculaire : la PCR

Cette méthode est en passe de devenir prépondérante notamment dans le domaine des greffes et pour l'exploration des allèles de classe II.
Elle consiste à réaliser une trentaine de cycles d'amplification d'une séquence génique grâce à deux amorces qui encadrent cette séquence. Chacun des cycles comprend trois phases thermodépendantes :
- dissociation des 2 brins de l'ADN à 95°C
- hybridation avec les amorces (séquences consensus aux divers allèles encadrant le fragment étudié)à 50°C
- copie de la séquence à amplifier grâce à une Taq polymérase thermostable à 75°C
Divers modes de révélation tels qu'une hybridation avec des sondes marquées ou non, spécifiques de tel ou tel allèle, ou tels que l'étude du polymorphisme des fragments de restriction ("RFLP") permettent alors de caractériser la portion de gène amplifiée et donc l'allèle correspondant.

CONCLUSION

L'architecture particulière des molécules HLA leur permet d'exercer la fonction de présentoir pour des peptides variés. Leur subdivision en 2 sous-familles (classe I et classe II) a doté le système immunitaire d'un double jeu de glycoprotéines fonctionnant en parallèle : chaque classe restreint la présentation des peptides à une sous-population particulière des lymphocytes T.

L'intérêt du système HLA en pratique courante réside dans son implication majeure en transplantation d'organes d'une part et d'autre part dans ses relations avec certaines situations pathologiques, maladies associées à HLA B27 ou liées à un allèle particulier notamment. La diversité des phénotypes possibles en fait en outre un marqueur extrêmement puissant utilisable dans les études familiales ou de populations et dans le domaine médico-légal (recherche de paternité ...).

Tableau récapitulatif :

	Classe I	**Classe II**	**CD1**
Gènes : - dans le CMH - chromosome 15 - chromosome 1	 9 92m	 9 et 9	 92*m* 9
Fragment présenté - lieu de contact - origine	peptide réticulum endoplasmique cytoplasmique, endogène	peptide endosomes "tardifs" extra cellulaire	*lipides et glycolipides* *endosomes "tardifs"* *enveloppes bactériennes (mycobactéries)*
Distribution	ubiquitaire	restreinte : - Cellules Présentatrices d'Antigène - lymphocytes T activés	*restreinte :*
Lymphocytes T - Corécepteur - Fonction	 CD8 cytotoxique, suppresseur	 CD4 auxiliaire ("helper") hypersensibilité retardée	
Particularités	Récepteurs inhibiteurs des cellules "Natural Killer"	Superantigènes	*pas de polyallélisme*

LES CELLULES DE L'IMMUNITÉ

I - INTRODUCTION

II - LE LYMPHOCYTE.

- **II - 1 - Distribution**
- **II - 2 - Morphologie**
  - **II - 2 - 1 - Microscopie optique**
    - II - 2 - 1 - 1 - Les petits lymphocytes
    - II - 2 - 1 - 2 - Les grands lymphocytes granuleux
    - II - 2 - 1 - 3 - Les lymphoblastes
  - **II - 2 - 2 - Microscopie à contraste de phase**
  - **II - 2 - 3 - Microscopie électronique**
    - II - 2 - 3 - 1 - Les grands lymphocytes granuleux
    - II - 2 - 3 - 2 - Les petits lymphocytes
  - **II - 2 - 4 - Microscopie électronique à balayage**
- **II - 3 - Le récepteur de l'antigène.**
- **II - 4 - Le lymphocyte B**
- **II - 5 - Le plasmocyte**
  - **II - 5 - 1 - Microscopie optique**
  - **II - 5 - 2 - Microscopie à contraste de phase**
  - **II - 5 - 3 - Microscopie électronique**
- **II - 6 - Le lymphocyte T**

III - LES CELLULES TUEUSES NATURELLES OU NK ("NATURAL KILLER")

- **III - 1 - Introduction**
- **III - 2 - Ontégénie, caractérisation et fonctions des cellules NK**
  - **III - 2 - 1 - Différenciation et maturation des cellules NK**
  - **III - 2 - 2 - Caractérisation des cellules NK**
  - **III - 2 - 3 - Propriétés fonctionnelles des cellules NK**
  - **III - 2 - 4 - Les cellules NK contrôlent la " qualité " de l'expression du CMH de classe I**
- **III - 3 - Les récepteurs des cellules NK**
  - **III - 3 - 1 - Récepteurs inhibiteurs.**
  - **III - 3 - 2 - Récepteurs activateurs**
- **III - 4 - Implications des cellules NK dans la réponse immunitaire**

IV - LES CELLULES NKT

V - LES CELLULES DENDRITIQUES

- **V - 1 - Introduction**

V - 2 - Rôle des cellules dendritiques
V - 3 - Distribution tissulaire des cellules dendritiques
V - 4 - L'origine de cellules dendritiques
V - 5 - Les deux sous-populations de cellules dendritiques
V - 6 - Les fonctions des cellules dendritiques
V - 6 - 1 - La fonction de capture des cellules dendritiques
V - 6 - 2 - La maturation et la migration des cellules dendritiques
V - 6 - 3 - La fonction de présentation des cellules dendritiques
V - 2 - Rôle des cellules dendritiques
V - 3 - Distribution tissulaire des cellules dendritiques
V - 4 - L'origine de cellules dendritiques
V - 5 - Les deux sous-populations de cellules dendritiques
V - 6 - Les fonctions des cellules dendritiques
IV - 6 - 1 - La fonction de capture des cellules dendritiques
IV - 6 - 2 - La maturation et la migration des cellules dendritiques
IV - 6 - 3 - La fonction de présentation des cellules dendritiques
V - 7 - Les cellules dendritiques à la frontière immunité innée/immunité acquise
V - 8 - Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance des lymphocytes
v - 9 - Implication des cellules dendritiques en immunologie clinique

VI - LES MACROPHAGES
VI - 1 - origine et description des macrophages
V - 1 - 1 - origine
V - 1 - 2 - description
VI - 2 - marqueurs membranaires des macrophages et contenu des lysosomes
VI - 3 - Fonctions des macrophages
VI - 3 - 1 - La phagocytose
VI - 3 - 2 - La présentation
VI - 3 - 3 - Modulation de la réponse immunitaire
VI - 3 - 4 - Cytotoxicité anticorps dépendante (ADCC)

VII - LE POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE

VII - 1 - Introduction
VI - 2 - Origine et devenir des PNN.
VI - 3 - granulations des PNN.
VII - 4 - Migration tissulaire des PNN
VII - 4 - 1 - roulement
VII- 4 - 2 - arrêt
VII - 4 - 3 - passage tissulaire
VII- 5 - Adhérence et phagocytose
VII - 6 - Fonctions tueuses et sécrétoires des PNN
VII - 6 - 1 - explosion oxydative (burst)
VII - 6 - 2 - système bactéricide indépendant de l'oxygène
VII - 6 - 3 - Les défensines, relais de l'immunité innée vers l'immunité acquise.
VII - 7 - Conséquences de l'activation du PNN

VIII - MASTOCYTES, POLYNUCLÉAIRES BASOPHILES ET ÉOSINOPHILES

VIII - 1 - MASTOCYTES

VIII - 1 - 1 - cytologie, origine et localisation tissulaire

VIII - 1 - 2 - dégranulation

VIII - 2 - POLYNUCLÉAIRES ÉOSINOPHILES

VIII - 2 - 1 - cytologie

VIII - 2 - 2 - granulations

VIII - 2 - 3 - origine, localisation tissulaire

VIII - 2 - 4 - récepteurs membranaires

VIII - 2 - 5 - fonctions des PNE

VIII - 3 - POLYNUCLÉAIRES BASOPHILES

VIII - 3 - 1 - cytologie, origine et localisation tissulaire

VIII - 3 - 2 - RFcεRI et dégranulation

LES CELLULES DE L'IMMUNITÉ : OBJECTIFS

Niveau A :

- **Lymphocyte T / TCR / CD3**
- **Lymphocyte B / BCR / CD19, CD20**
- **Plasmocyte/anticorps, lymphocyte B/sIg**
- **LGL = NK + CTL**
- **Clonotypie / monospécificité**
- **Diversité recombinatoire**
- **Epitope T / séquentiel, épitope B / conformationnel**
- **Restriction CMH**
- **Classe I / CD8, classe II / CD4**
- **ADCC**
- **Phénotype NK**
- **Récepteurs NK : grandes familles, soi manquant**
- **Définition NKT**
- **Cellule dentritique : seule CPA des lymphocytes T naïfs**
- **DC immatures, matures ; DC1, DC2**
- **3 fonctions du macrophage**
- **phagocytose**
- **neutropénie, polynucléose**
- **margination**
- **différentes granulations du PNN**
- **marqueurs spécifiques des granulations**
- **mécanismes de roulement, adhérence et diapédèse**
- **récepteurs d'opsonines**
- **explosion oxydative : grands mécanismes**
- **défensines**
- **mastocytes muqueux, conjonctifs**
- **métachromasie**
- **RFcεRI et dégranulation du PNB, du mastocyte**
- **PNE : cytotoxicité, éotaxine, IL-5**

Niveau B :

- **Effets de la bursectomie, thymectomie**
- **lymphoblaste**
- **numération des lymphocytes : lymphocytose, lymphopénie**
- **sous-populations NK**
- **mécanisme de cytotoxicité NK**
- **différenciation NK**
- **récepteurs NK : structure**
- **signaux de maturation des cellules dendritiques**
- **synapse immunologique**
- **différents noms du macrophage**
- **marqueurs membranaires du macrophage**
- **contenu des granulations du PNN**
- **noms des sélectines, intégrines**

- **autres récepteurs que RFcεRI du mastocyte**

LES CELLULES DE L'IMMUNITÉ

I - INTRODUCTION

Nous rappellerons que le système immunitaire peut être conçu comme un réseau d'opérateurs, traitant des informations et possédant une branche afférente de reconnaissance de l'antigène, et une branche efférente, effectrice, d'élimination de l'antigène.

Le traitement de l'information entre les différents acteurs cellulaires du système immunitaire peut se faire selon deux modes :

- contact cellulaire direct par des interactions spécifiques entre des couples ligand/récepteur (exemple : CD28/B7, CD40/CD40L, Fas/FasL, etc...)
- interaction spécifique médiateur/récepteur (exemple : antigène/récepteur d'antigène [TCR ou immunoglobuline], cytokine/récepteur de cytokine, etc...).

Nombre de ces cellules prennent leur origine dans la moelle osseuse, puis vont patrouiller à l'intérieur du réseau des circulations sanguine et lymphatique, traversant des organes lymphoïdes qui sont les sites privilégiés de la rencontre avec l'antigène. Chaque type cellulaire est équipé de molécules membranaires et de molécules sécrétées qui lui permettent d'accomplir ses fonctions en relation avec les cellules voisines, et qui sont autant de marqueurs phénotypiques qui les caractérisent.

II - LE LYMPHOCYTE.

C'est la cellule qui supporte la réponse immunitaire adaptative.

II - 1 - DISTRIBUTION

Les lymphocytes représentent 20 à 30 %, soit **1500 à 4000/µL**, des **leucocytes** du sang. On parle de **lymphopénie** pour un chiffre inférieur à 1500/µL, et de **lymphocytose** pour un chiffre supérieur à 5000 /µL chez l'adulte.

Les lymphocytes sanguins ne sont qu'une faible partie du pool corporel, estimé à $\mathbf{10^{12}}$ chez l'adulte.

On retrouve les lymphocytes dans quatre sites principaux : la moelle osseuse, le thymus, les organes lymphoïdes périphériques (ganglions, rate) et les surfaces muqueuses. Ils dérivent tous d'une cellule souche qui migre dans les **organes lymphoïdes primaires** que sont la moelle osseuse et le thymus: ils acquièrent là, par des mécanismes de recombinaison génétique que nous décrirons plus tard, leur récepteur spécifique d'un antigène donné. Cette acquisition, indépendante de la présence de l'antigène, se fait au prix de la mort, par **apoptose** ou mort cellulaire programmée, des nombreuses cellules qui opèrent des réarrangements non fonctionnels. Les lymphocytes matures, porteurs d'un récepteur fonctionnel, quittent alors les organes lymphoïdes primaires: ils sont appelés lymphocytes **naïfs** car ils n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique. Ils vont patrouiller dans la circulation sanguine et coloniser les organes lymphoïdes périphériques et les surfaces muqueuses où ils sont susceptibles de rencontrer leur antigène. La **recirculation** des lymphocytes entre les organes lymphoïdes secondaires et le sang est une propriété fondamentale qui maintient en permanence la disponibilité de l'intégralité du répertoire en tout site de l'organisme à tout instant.

II - 2 - MORPHOLOGIE

Le lymphocyte est une petite cellule du sang, sans caractéristique particulière en microscopie optique et sans fonction connue jusqu'à la fin des années cinquante et la découverte de GOWANS.

Celle- ci résulte des confrontations des résultats de modèles expérimentaux et de données pathologiques humaines :

*On avait constaté que chez l'animal les effets de la **thymectomie** sur la réponse immunitaire était fonction de sa date de réalisation. Chez le nouveau-né des troubles majeurs (infections virales, mycotiques, à bactéries de développement intra-cellulaire) apparaissaient précocement et étaient rapidement létaux, alors que chez l'adulte le délai d'apparition était beaucoup plus tardif et la sévérité moindre.*

Dans le modèle priviligié que constitue le poulet, les expériences de **thymectomie néonatale** et de **bursectomie néonatale** ont clairement démontré qu'il existe deux sous-populations de lymphocytes, les **lymphocytes T** et les **lymphocytes B**, que rien ne séparent sur le plan morphologique en microscopie optique.

Les premiers, qui sont éduqués dans le thymus, sont responsables de l'immunité cellulaire et permettent donc de faire face aux agressions par les pathogènes de développement intracellulaire, alors que les seconds, qui se différencient dans la bourse de FABRICIUS chez les oiseaux, permettent de lutter contre les infections à développement extra-cellulaire.

*Cette dichotomie avait été constaté en clinique. Vers la fin des années cinquante, un pédiatre américain, BRUTON, décrivait chez de jeunes enfants de sexe masculin, des tableaux d'infections pulmonaires ou ORL récidivantes, dont l'analyse du sérum par électrophorèse, qui commençait à être utilisée en routine hospitalière, objectivait une absence de gammaglobulines. Cette **agammaglobulinémie liée au sexe** est l'équivalent de la bursectomie chez l'oiseau, et se caractérise principalement par une absence d'anticorps, une absence de lymphocytes B matures alors que les lymphocytes T sont normaux en nombre et en fonction. A l'inverse il existe un syndrome, décrit par DI GEORGE, qui est la conséquence d'une malformation congénitale des troisièmes et quatrièmes arcs branchiaux avec pour conséquence une hypocalcémie par absence de glandes parathyroïdes, des malformations des gros vaisseaux du coeur et une aplasie thymique plus ou moins complète. Celle-ci se traduit par des infections gravissimes à pathogènes de développement intracellulaire, qui surviennent dès la naissance, contrairement aux infections observées dans la maladie de BRUTON, compte-tenu de la protection conférée par les anticorps maternels de classe IgG passivement transmis pendant la grossesse.*

Qu'il soit B ou qu'il soit T, le lymphocyte ne devient fonctionnel qu'après rencontre avec son antigène spécifique. Il n'y a pas de différence morphologique entre le **lymphocyte B**, dont le stade de différenciation ultime est le **plasmocyte** ou cellule productrice d'anticorps, et le **lymphocyte T**, support de l'immunité à médiation cellulaire et capable de se différencier soit en cellule **auxiliaire ("helper")** capable d'activer les autres cellules du système immunitaire, soit en cellule **cytotoxique** capable d'éradiquer les pathogènes intra-cellulaires.

II - 2 - 1 - Microscopie optique

En microscopie optique, par les colorations usuelles de type MAY-GRÜNEWALD-GIEMSA, on distingue selon la morphologie, et plus particulièrement la taille et à un moindre degré le contenu cytoplasmique, des **petits** et des **grands lymphocytes** dont nous venons de voir qu'ils ne correspondent pas à la dichotomie fonctionnelle B/T. Les grands lymphocytes correspondent soit aux **grands lymphocytes granuleux,** soit aux **lympoblastes.**

II - 2 - 1 - 1 - Les petits lymphocytes

Il s'agit de petites cellules de **6 à 9 µ** de diamètre pour un volume de **2 à 300 µ^3**. Leur noyau est ovalaire, occupe les neuf dixièmes de la cellule. Il apparaît très dense, violet foncé, avec une chromatine sombre, condensée, signe de faible activité transcriptionnelle, corroborée par l'absence de réticulum endoplasmique rugueux dans la mince couronne cytoplasmique. Les nucléoles sont peu visibles. Dans une mince frange cytoplasmique basophile, on décrit un corps de GALL et très peu de granulations.

II - 2 - 1 - 2 - Les grands lymphocytes granuleux

Ce sont des cellules de **9 à 15 µ** de diamètre pour un volume de **3 à 900 µ^3**. Leur noyau est central ou légèrement excentré, un peu plus foncé que celui des petits lymphocytes, entouré totalement d'une mince couronne cytoplasmique. La chromatine est en mottes et les nucléoles peu visibles. Dans le cytoplasme basophile on observe, outre un corps de GALL, quelques granulations azurophiles (une à six), qui explique le nom donné à ces lymphocytes; Ces **LGL** (pour "Large Granular Lymphocytes") sont des cellules douées de propriétés cytotoxiques, et regroupent les **lymphocytes T cytotoxiques (**CTL, voir cours spécifique) et les **cellules NK** (pour "Natural Killer cells", cf infra).

II - 2 - 1 - 3 - Les lymphoblastes

Les lymphoblastes sont des cellules **activées**, précurseurs des lymphocytes matures et ne s'observent qu'après **stimulation** par leur **antigène** spécifique in vivo, ou par des mitogènes in vitro tels que la phytohémagglutinine. Il s'agit de grandes cellules de 15 à 20 µ de diamètre, au noyau ovalaire, arrondi, réniforme, rose clair. La chromatine y apparaît fine, nuageuse avec un à deux nucléoles parfaitement visible. Le cytoplasme est basophile à renforcement périphérique, garni de ribosomes, tous témoins d'une intense activité synthétique. On observe un corps de GALL. La cellule se divise alors avec deux à quatre cycles cellulaires par jour pendant trois à cinq jours. Le lymphocyte d'origine peut ainsi donner naissance rapidement à mille cellules filles.

II - 2 - 2 - Microscopie à contraste de phase

*La microscopie à contraste de phase permet d'étudier les mouvements des cellules. Contrairement aux cellules phagocytaires telles que les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, les lymphocytes ne s'étalent pas et restent sphériques. Le corps de GALL est plus visible, ainsi que les mitochondries, disposées en arc de cercle autour du centrosome, déformant un peu le noyau. Ce sont des cellules qui sont capables d'adhérer à d'autres cellules par le jeu de molécules d'adhérence spécifiques, regroupées sous le vocable d'adhésines. Elles sont douées de la capacité de ramper autour d'autres cellules (**péripolèse**), voire de pénétrer à l'intérieur en créant des brèches (**empolèse**), toutes propriétés qui leur permettent de constamment pouvoir circuler entre les compartiments sanguins et tissulaires par **diapédèse**. Lors de ces passages le lymphocyte prend un aspect de miroir à manche, constitué par une expansion cytoplasmique que l'on nomme l'uropode.*

II - 2 - 3 - Microscopie électronique

La microscopie électronique confirme la pauvreté en organites intracellulaires des lymphocytes. Elle montre l'existence de nucléoles qui ne sont pas visibles en microscopie optique, mais n'explique pas le corps de GALL.

II - 2 - 3 - 1 - Les grands lymphocytes granuleux

Leur noyau est clair, encoché au niveau du centre. Il existe le plus souvent deux nucléoles. L'appareil de Golgi est petit. Le corps de GALL apparaît comme une structure ronde, avec un centre gris et une couronne plus dense, riche en lipides. Le cytosquelette, l'ergastoplasme sont peu développés. Les ribosomes et les polysomes sont peu nombreux.

II - 2 - 3 - 2 - Les petits lymphocytes

Qu'ils soient grands ou petits, ce sont des cellules qui sont encore plus pauvres en organites intracellulaires que les LGL.

II - 2 - 4 - Microscopie électronique à balayage

La microscopie à balayage ne permet pas plus que les autres techniques de différencier les lymphocytes T des lymphocytes B. Les lymphocytes sont incapables d'ingérer des particules (phagocytose). Ils sont par contre capables d'endocyter des substances solubles (pinocytose).

II - 3 - LE RÉCEPTEUR DE L'ANTIGÈNE.

Chaque lymphocyte ne porte qu'un seul type de récepteur (clonotypique), d'où le terme de **monospécificité**. Ils font partie d'une famille, celle des immunorécepteurs, impliqués dans l'activation des lymphocytes.

En cas contraire, de lymphocyte à plusieurs spécificités, la réponse immunitaire à un antigène donné dégénérerait en s'étendant à des antigènes "innocents". Cette spécificité a un support génétique que nous reverrons.

Au cours de son processus de maturation chaque lymphocyte crée un récepteur unique par une mécanique **recombinatoire** génétique.

*C'est le mérite de TONEGAWA d'avoir montré en 1976, dans le cas des gènes des immunoglobulines du lymphocyte B comment la diversité des anticorps était obtenue. A l'époque la structure des immunoglobulines était connue avec l'existence de **domaines** variables et constants sur les deux chaînes lourdes et légères. TONEGAWA montra que le gène codant pour le fragment variable résultait du rapprochement au hasard de plusieurs segments éclatés dans le génome.*

Ce mécanisme a trois conséquences importantes:

- un nombre **limité de gènes** est capable de créer une grande **diversité d'anticorps.**
- un réarrangement donné est **propre** à une cellule, ce qui explique la **spécificité**.
- un réarrangement est **irréversible**: toutes les cellules filles en hériteront.

Le même processus s'applique au lymphocyte T qui ne possède qu'un site de liaison à l'antigène à la différence des immunoglobulines qui en possède deux.

Qu'il soit T ou qu'il soit B, le récepteur de l'antigène résulte de l'association de deux chaînes qui participent toutes les deux à la formation du site de liaison: ceci introduit un niveau supplémentaire de diversité, dite **combinatoire**. Ainsi donc un très petit nombre de gènes est capable de créer une importante diversité de récepteurs: on compte environ 10^9 à 10^{11} lymphocytes différents chez un individu, capables de reconnaître autant de motifs antigéniques différents : l'ensemble de ces récepteurs constitue ce que l'on appelle le **répertoire**. Nous verrons qu'il existe un **répertoire B** et un **répertoire T.**

II - 4 - LE LYMPHOCYTE B

Les lymphocytes B sont le support de l'immunité **humorale** qui repose sur la présence d'**anticorps** spécifiques, et donc transférable par le sérum. Cette immunité humorale est responsable des réactions d'hypersensibilité de type I (anaphylaxie), II (cytotoxicité) et III (complexes immuns).

En cytométrie en flux les marqueurs utilisés pour identifier les lymphocytes B sont les marqueurs **CD19** et **CD20**. Ce sont en effet des marqueurs spécifiques de la lignée B, exprimés tout au long de celle-ci (pan-B).

Le récepteur d'antigène du lymphocyte B (**BCR** pour "B cell receptor") reconnaît directement les antigènes natifs, en solution ou à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules folliculaires dendritiques. Cette reconnaissance fait intervenir son **paratope,** qui associe les deux régions variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, capable de se lier à l'**épitope** de l'antigène. Ceci est le support de la **spécificité** de la réponse humorale. Un lymphocyte B donné synthétise des molécules d'immunoglobulines qui portent toutes le même paratope. Selon le stade de différenciation de la cellule, cette immunoglobuline peut être soit exprimée à la surface de la cellule, soit sécrétée. Dans le premier cas on parle d'**immunoglobuline de surface** ou de membrane (sIg). Dans le second on l'appelle **anticorps**.

Chez l'homme, les lymphocytes B représentent à peu près **5 à 15 %** des lymphocytes sanguins, soit **200 à 400/µL.** Pour la majorité ils expriment deux isotypes d'immunoglobulines, IgM et IgD, porteurs de la même spécificité anticorps (même paratope, donc même idiotype). Les lymphocytes B porteurs d'immunoglobulines de membranes d'autres isotypes (IgG, IgA et IgE) sont beaucoup moins fréquents. Cependant certains tissus sont particulièrement riches en certains de ces lymphocytes ; c'est le cas des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, enrichis en lymphocytes B à IgA de surface.

II - 5 - Le plasmocyte

Le plasmocyte est la cellule spécialisée dans la synthèse et la **sécrétion** des anticorps. Elle provient de la différenciation terminale du lymphocyte B, six à sept mitoses après l'activation du lymphocyte B naïf, et secrète les immunoglobulines à la différence des lymphocytes B de tous les stades précédents qui ne les synthétisent qu'en vue d'une expression membranaire.

Il s'agit d'une cellule ubiquitaire, essentiellement localisée dans les tissus. Physiologiquement on ne le retrouve pas dans le sang circulant; il ne représente que 1 à 3% des cellules de la moelle osseuse. Au-delà de 5% une plasmocytose médullaire est considérée comme pathologique. Il migre dans la moelle osseuse à partir des ganglions ou de la rate, via la circulation lymphatique.

On le retrouve dans la peau, dans la zone médullaire des ganglions, dans les cordons de Billroth de la pulpe rouge de la rate, dans les chorions muqueux. La particularité des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses est la prédominance des plasmocytes à IgA, puisque cet isotype est l'isotype majeur retrouvé à ce ni veau, sous la forme particulière de l'IgA sécrétoire.

II - 5 - 1 - Microscopie optique

Le plasmocyte a une morphologie très différente du lymphocyte: il se présente comme une cellule ovalaire, au noyau excentré, avec un cytoplasme abondant et basophile car riche en réticulum endoplasmique, appareil de Golgi et ribosomes. Ceci traduit une **intense activité sécrétoire.**

En microscopie optique, le plasmocyte est une cellule ovalaire de 12à 14 µ de diamètre dans son grand axe. Elle a grossièrement la forme d'une écaille d'huître. Son noyau est excentré, perpendiculaire au grand axe de la cellule. La chromatine est condensée en périphérie, adoptant la forme de rayons de roue,

violette foncée sur fond rougeâtre. Le nucléole n'est pas visible. Le cytoplasme est très basophile car riche en réticulum endoplasmique.

Ceci s'explique par l'intense activité sécrétoire de cette cellule qui fonctionne comme une **usine à fabriquer des anticorps**.

Les immunoglobulines représentent 10 à 20 % des protéines synthétisées par le plasmocyte, soit environ 2000 molécules d'Ig par seconde. L'intensité de la basophilie diminue au fur et à mesure que l'on se rapproche du noyau, donnant un aspect typique identifié sous le nom d'archoplasme (croissant cytoplasmique clair au contact du noyau). Il existe de très rares granulations azurophiles.

Le plasmocyte n'exprime plus à sa surface ni immunoglobuline, ni antigène HLA de classe II. Il n'a donc plus de possibilité de contact avec l'antigène ou le lymphocyte T auxiliaire $CD4^+$ TH2. Il ne peut donc que synthétiser et sécréter des anticorps, ceci pendant les deux semaines de sa durée de vie pour un plasmocyte à IgG ou IgA, de deux à trois jours pour ceux à IgM. N'ayant plus aucune possibilité de contrôle via le BCR ou le lymphocyte T, la réponse anticorps ne cesse qu'avec la disparition du plasmocyte producteur.

II - 5 - 2 - Microscopie à contraste de phase

En microscopie à contraste de phase, le cytoplasme paraît très foncé, presque noir, avec une grande réfringence. On n'observe pas de phagocytose, la micropinocytose est possible.

II - 5 - 3 - Microscopie électronique

En microscopie électronique, le noyau est constitué de grosses mottes de chromatine. Le cytoplasme est riche en réticulum endoplasmique (ergastoplasme rugueux), témoin de la synthèse protéique très développée. Il existe de nombreuses mitochondries , qui fournissent l'énergie nécessaire à la forte activité synthétique. L'appareil de Golgi est localisé dans l'archoplasme. On retrouve un ergastoplasme lisse, sans ribosome, où s'effectue le branchement des copules polysaccharidiques.

II - 6 - Le lymphocyte T

Les lymphocytes T représentent environ **70 %** des lymphocytes sanguins, soit **1 100 à 1 700/µL** chez l'adulte.

Le marqueur pan-T utilisé en cytométrie en flux pour numérer les lymphocytes T est le marqueur **CD3**, molécule de signalisation étroitement et obligatoirement associée au TCR (voir cours *"TCR"*).

Chaque lymphocyte T est porteur d'un TCR unique qui est le résultat de l'association covalente, par un pont disulfure de deux chaînes. Pour 95 % des lymphocytes T sanguins périphériques il s'agit de **chaînes** 9 **et** 9. Une infime minorité, moins de **5 %**, de lymphocytes T est porteuse d'un deuxième type de TCR constitué de deux chaînes 1 **et** 1, que nous détaillerons ultérieurement.

Le lymphocyte T est la cellule qui supporte l'immunité à médiation **cellulaire**. Le lymphocyte T a un rôle fondamental dans la réponse immunitaire : il l'exerce à deux niveaux, lors :

- de la **reconnaissance** de la majorité des antigènes exogènes, dits thymodépendants
- de la phase **effectrice**.

Dans la réponse immunitaire spécifique adaptative celle-ci est dirigée contre des antigènes de localisation **intracellulaire**, qui pour certains, sont capables, même après phagocytose, de résister aux mécanismes de destruction des cellules qui les ont ingérés.

A ce titre les lymphocytes T sont impliqués dans :

- la réponse immunitaire cellulaire vis-à-vis d'agents bactériens ou viraux
- le rejet des greffes (voir cours de DCEM III, module 8 du pôle 4)
- le rejet des tumeurs (voir cours de DCEM I, certificat d'Oncologie)

- les réactions d'hypersensibilité retardée

A la différence du lymphocyte B, support de l'immunité humorale, qui est capable de reconnaître des antigènes solubles dans leur conformation native grâce à son immunoglobuline de surface, le lymphocyte T ne reconnaît que des fragments de l'antigène, préalablement dégradé par des cellules présentatrices d'antigène **(CPA)** capables de les réexprimer à leur surface associés aux molécules "présentoirs" que sont les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité **(CMH)**.

Par analogie avec le récepteur pour l'antigène du lymphocyte B (BCR) on peut comparer le TCR à un **Fab** qui, tout comme l'immunoglobuline de surface, a besoin d'un complexe multimoléculaire associé, pour son expression membranaire et la transmission de l'activation consécutive à la liaison à l'antigène : pour le BCR il s'agit des molécules CD79a et CD79b (ou Ig9 et Ig9) et pour le TCR du complexe **CD3**. L'analogie s'étend aux mécanismes générateurs de la diversité des récepteurs puisque les mêmes mécanismes de recombinaison génétique sont à l'origine des répertoires T et B.

Les trois principales différences entre le BCR et le TCR résident dans leur capacité de **valence** (monovalence du TCR et bivalence du BCR) et dans la présence obligatoire de **co-récepteurs** du TCR imposée par la reconnaissance simultanée du peptide antigénique présenté par le CMH. Les co-récepteurs varient selon la nature de l'antigène du CMH : la reconnaissance des antigènes de **classe I** requiert la molécule **CD8** et celle des antigènes de **classe II** la molécule **CD4**. Ainsi sont définies deux sous-populations de lymphocytes T : les lymphocytes T $CD4^+$ et $TCD8^+$. Nous verrons que selon le profile de cytokines sécrétées, la sous-population T CD4 se partage en Th1 et Th2.

Cette restriction par les molécules du CMH impose de plus des contraintes de taille : alors que le BCR peut lier des antigènes de taille variable (de l'haptène jusqu'à des complexes moléculaires de plusieurs centaines de kiloDaltons), le TCR ne peut que lier des peptides d'une dizaine d'acides aminés. Enfin, à la différence de l'immunoglobuline qui peut exister sous deux formes (membranaire ou sécrétée) avec des fonctions différentes, le TCR n'existe qu'à la surface du lymphocyte T : il n'y a **pas de forme sécrétée**. Enfin la physiologie du lymphocyte T diffère de celle du lymphocyte B : seul le premier est doté de propriété d'auto-renouvellement. Ceci est un avantage technique pour l'étude des lymphocytes T, que l'on peut cloner et cultiver *in vitro* relativement facilement.

A la différence des **épitopes B** qui sont **conformationnels** et exprimés à la surface des molécules d'antigènes, les **épitopes T** sont **séquentiels**, et peuvent être enfouis au sein de la molécule native.

III - LES CELLULES TUEUSES NATURELLES OU NK ("NATURAL KILLER")

Dans le milieu immunologique, les cellules NK (Natural Killer), de simples "porte-flingues" ont progressivement acquis le statut de "caïd". Nous allons voir cette saga d'une cellule initialement définie par sa seule capacité à tuer, exécuteur "bête", puisque non spécifique de l'antigène. Lointain membre du clan lymphocytaire, avec qui elle partage certains mécanismes d'activation et de signalisation, elle se voit promue au rang plus noble d'ingénieur qualiticien chargé, dans l'économie de la réponse immunitaire, de contrôler la qualité de l'expression du HLA, aux confins des réponses innée et adaptative qu'elle module par les cytokines qu'elle sécrète. Son implication dans des pathologies variées (autoimmunité, cancers, déficits immunitaires) laisse espérer des espoirs thérapeutiques, initiés par les travaux pionniers de Rosenberg en 1985 avec ses LAK (lymphocyte activated killer).

III - 1 - INTRODUCTION

Les **cellules tueuses naturelles** ou **NK** ("natural killer") sont un troisième type de lymphocyte, qui n'expriment pas de récepteur spécifique de l'antigène et qui sont impliquées dans la **réponse immunitaire naturelle**. Elles sont capables de lyser spontanément,

directement ou indirectement, des cellules tumorales ou infectées par un virus. Dans le deuxième cas l'opsonisation des cellules par des anticorps permet la liaison à des récepteurs membranaires spécifiques des parties constantes des IgG. On parle alors de cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante (**ADCC** pour "**A**ntibody **D**ependent **C**ellular **C**ytotoxicity").

D'origine lymphocytaire ces cellules ne sont **ni B** (pas de réarrangement des gènes des immunoglobulines) **ni T** (pas de réarrangement des gènes du TCR) et se définissent principalement par leur fonction : elles exercent une **cytotoxicité naturelle** grâce à un arsenal cytotoxique qu'elle possède de façon constitutive.

Elles représentent **5 à 20 %** des lymphocytes du sang périphérique, soit **200 à 400/µL**, sont de localisation principalement splénique.

Comparativement aux lymphocytes T le mode de reconnaissance des lymphocytes NK apparaît très peu sophistiqué. **Aucune cellule présentatrice n'est nécessaire** : il n'y a pas de restriction, notamment par le CMH.

Cependant, il est apparu vers les années 80 que la cytotoxicité NK s'exerce principalement vis à vis de cibles cellulaires dont l'expression du CMH de classe I est déficiente. Cette caractérisation fonctionnelle a permis d'identifier de nouvelles familles de récepteurs appelés NCR pour Natural Cytotoxicity Receptors et NKR pour Natural Killer Cell Receptors, dont certains ont pour ligands les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Parmi ces récepteurs, certains ont une fonction inhibitrice de la cytotoxicité, d'autres exercent une fonction activatrice. Certains récepteurs activateurs de la cytotoxicité reconnaissent des ligands exprimés en situation de " stress " cellulaire (infection virale, transformation tumorale…).

Les structures reconnues sur les cellules cibles par les cellules NK semblent être des glycosphingolipides de type ganglioside ou des glycosaminoglycannes de type chondroïtine sulfate. Ce sont le plus souvent des composants de structure normale des membranes cellulaires : il est donc nécessaire qu'interviennent des mécanismes de contrôle, sans quoi toutes nos cellules seraient des cibles potentielles de l'activité NK.

III - 2 - Ontégénie, caractérisation et fonctions des cellules NK

III - 2 - 1 - Différenciation et maturation des cellules NK

La différenciation des cellules NK n'est pas encore clairement définie. Il est admis que les cellules NK dérivent d'un **progéniteur commun** avec les **lymphocytes T** : l'absence de réarrangement des gènes du TCR qui les définit, entre autre, exclut cependant un développement intra-thymique.

Leur différenciation s'effectuerait dans la **moelle osseuse** à partir d'un progéniteur hématopoïétique au contact du micro-environement. Plusieurs cytokines sont impliquées : flt3-ligand et c-kit ligand à un stade précoce, **IL-15**, et plus accessoirement l'IL-21, pendant le développement et la différenciation du compartiment NK.

A la suite de leur différenciation médullaire beaucoup d'inconnues persistent quant à la localisation et à la recirculation des cellules NK dans l'organisme. Certains organes comme le foie et l'utérus contiennent de nombreuses cellules NK alors que les ganglions périphériques, en dehors de situations pathologiques, en sont quasiment dépourvus.

III - 2 - 2 - Caractérisation des cellules NK

Les cellules NK, en microscopie optique, sont retrouvées dans la population des **grands lymphocytes granuleux** (**LGL** pour "**L**arge **G**ranular **L**ymphocyte"), qui regroupe des populations lymphocytaires à fonction cytotoxique. Presque tous les NK sont des LGL, mais seulement 60 à 80 % des LGL sont des NK : les autres LGL sont des lymphocytes T cytotoxiques principalement CD8+ (CTL). L'arsenal cytotoxique de ces cellules est contenu dans les granules.

Il n'existe pas à ce jour de marqueurs spécifiques des cellules NK disponibles dans le commerce : par cytométrie en flux il n'est donc pas possible de définir positivement ces cellules, comme on peut le faire pour les lymphocytes T avec le marqueur CD3, ou pour les lymphocytes B avec le CD19. On décrit cependant depuis peu, parmi les récepteurs activateurs, des récepteurs spécifiques du compartiment NK (NKp46, NKp44 ou NKp30, voir infra).

Les cellules NK se caractérisent par des marqueurs positifs qui sont **CD16** et **CD56** et un marqueur négatif, CD3.

Le phénotype des cellules NK est donc $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$, $CD94^+$, $LFA\text{-}1^+$. Pour 85 % elles sont $CR3^+$ (CD11b/CD18), 80 % $CD2^+$, 50-60 % $CD57^+$ et 30 % $CD8^+$.

Dans ce dernier cas il s'agit d'un homodimère CD8 9*, faiblement exprimé.*

Le CD56 est une isoforme d'une protéine d'adhérence, la molécule N-CAM, retrouvée aussi sur un très faible pourcentage de lymphocytes T doués d'activité NK (cf infra, lymphocytes NKT).

*Le récepteur CD16 exprimé à la surface des cellules NK est le Fc*1*RIIIA, troisième récepteur pour la portion Fc des IgG. Il s'agit d'une molécule transmembranaire qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, car possédant deux domaines de type C2 dans sa portion extra-cellulaire. Son gène est localisé sur le chromosome 1. Le Fc*1*RIII A s'associe à la surface des cellules NK à un dimère (soit* 11*, soit* 11*, soit* 11*) associant les chaînes* 1 *du CD3 et/ou* 1 *du Fc*1*RI. Ce dimère a pour fonction d'assurer la transduction du signal.*

On retrouve à la surface des cellules NK des protéines ou glycoprotéines présentes sur les autres sous-populations de cellules immunocompétentes, permettant les échanges indispensables à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée.

Ce sont des molécules de co-stimulation telles que, CD40-Ligand, CD2 et 2B4 (CD244) ainsi que des molécules d'adhérence telles que LFA-1 (Leucocyte function antigen-1), CD62L, CD44, CD49e et CD18/CD11, et des récepteurs aux cytokines : IL-1R, IL2-Rαβγ, c-kit déjà cité, IL-12R, IL-15R, IL-18R et IL21R et aux chemokines : CXCR3, CXCR1et CX_3CR1.

Le niveau d'expression de ces différents récepteurs notamment celui de CD56 varie. Deux populations de cellules NK sanguines, fonctionnellement différentes, sont individualisées en fonction de l'intensité d'expression des marqueurs CD56 et CD16, et de leur capacité cytotoxique ou productrice de cytokines (l'IFN-γ, l'IL-10, le TNF-α et le TNF-β). Leurs propriétés sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Cellules NK	CD56	CD16	cytotoxicité	cytokines
10 %	+++	+	+	+++
90 %	+	+++	+++	+

III - 2 - 3 - Propriétés fonctionnelles des cellules NK

Avec les macrophages et les polynucléaires, les cellules NK sont une des composantes de l'immunité innée cellulaire. Outre leur fonction de cytotoxicité naturelle, elles assument, par la production de cytokines et de chemokines, qui semblent définir des sous-populations, une fonction de coopération cellulaire et interviennent dans l'orientation de la réponse immunitaire acquise.

Les cellules NK utilisent la même machinerie cellulaire que celles des lymphocytes T cytotoxiques pour détruire leurs cibles cellulaires par cytotoxicité naturelle ou par cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). C'est principalement l'exocytose des

granules contenant de la **perforine** et du **granzyme**, l'expression de **Fas-L** ou de **TRAIL** (TNF-related apoptosis inducing ligand) qui en sont les mécanismes effecteurs.

La différence avec les lymphocytes T se situe au stade initial du signal d'activation. La cellule NK ne possède pas de récepteur intrinsèque pour l'antigène. Elle acquiert un " répertoire " antigénique par la fixation d'IgG *via* le CD16 qui permet la transduction du signal activateur.

Les lymphocytes NK interviennent également dans la coopération cellulaire par la production de **cytokines**. Elles produisent des cytokines de type T_H1 (IFNγ) et de type T_H2 (IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13). Elles produisent également des **cytokines pro-inflammatoires**, TNFα, IL-10, du TGFβ, de l'IL-3 et des **chémokines**, IL-8, MIP-1α, MIP-1β et RANTES. Contrairement lymphocytes T CD4+, la production de cytokines de type T_H1 ou T_H2 ne correspondrait pas à deux types de différenciation fonctionnelle terminale, mais a des stades de maturation NK.

Les cellules NK immatures seraient de type 2, produisant de l'IL-13 et de l'IL-5, exerçant la cytotoxicité via TRAIL et proliférant en réponse à l'IL-4. Ces cellules immatures se différencient, sous contrôle de l'IL-12 et de chémokines, en type 0 (intermédiaire), puis en type 1 (mature). Ces cellules matures produisent principalement de l'IFNγ et exerçent leur cytotoxicité par Fas-L et perforine/granzyme.

La cellule NK n'est donc pas seulement un " tueur " du système immunitaire, mais une cellule potentiellement capable par sa production de cytokines d'orienter la réponse immunitaire adaptative.

III - 2 - 4 - Les cellules NK contrôlent la " qualité " de l'expression du CMH de classe I

Par leur cytotoxicité naturelle, les cellules NK sont des cellules potentiellement auto-réactives dont l'activation doit être étroitement contrôlée. Klas KÄRRE a été le premier a remarqué que l'expression des molécules du CMH de classe I protégeait une cellule cible, tumorale ou infectée, de la cytotoxicité NK. Il a traduit ce phénomène par le concept du **" soi manquant ".**

On a rapidement identifié ces récepteurs pour les molécules du CMH de classe I, capables d'inhiber à la fois les programmes de cytotoxicité et de production de cytokines des cellules NK. On les a appellés **KIR** (Killer Inhibitory Receptors). Ils se répartissent en deux catégories : ceux appartenant à la **superfamille des immunoglobulines** et ceux appartenant à la famille des **lectines de type C**. Une cellule cible qui exprime une molécule du CMH de classe I capable d'être reconnue par un de ces récepteurs exprimés sur la cellule NK sera protégée de la lyse.

Dans la dynamique d'une réponse anti-virale, cette stratégie de reconnaissance fait de la cellule NK, agent de l'immunité innée, mobilisée en premier, un outil adapté de réponse aux ruses employées par les virus pour déjouer la réponse immunitaire adaptative. La baisse d'expression des molécules du CMH de classe I est l'une des premières conséquences de l'infection virale d'une cellule de l'organisme. La réponse immunitaire adaptative, qui apparaît après un certain délai, repose sur l'action des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques qui ne peuvent exercer leur cytotoxicité que sur une cible CMH classe I positive présentant l'antigène.

Les récepteurs de type KIR permettent ainsi de différencier les cellules normales, des cellules tumorales ou infectées par des virus pour lesquelles l'absence ou l'altération de l'expression d'un ou de plusieurs allèles de classe I conduit à la lyse cellulaire par les cellules NK.

Les travaux des dernières années ont montré que l'activité des cellules NK ne correspondait pas simplement à la levée d'une inhibition, contrôlée par l'absence d'expression de molécules du CMH classe I sur la cible. Il existe aussi des signaux **activateurs** pour la

cytotoxicité ou la production de cytokines. Les fonctions NK sont donc étroitement régulées par un ensemble de récepteurs. Ces récepteurs inhibiteurs ou activateurs sont appelés **NCR** pour Natural Cytotoxicity Receptors et **NKR** pour Natural Killer Cells Receptors. Ils ne sont pas tous spécifiques des cellules NK puisqu'un bon nombre de ces récepteurs sont également exprimés par des sous-populations lymphocytaires T.

III - 3 - Les récepteurs des cellules NK

III - 3 - 1 - Récepteurs inhibiteurs.

Chez l'homme, les récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules NK appartiennent soit à la **superfamille des immunoglobulines** (Ig), soit à la superfamille des **lectines dimériques de type C**.

*Les premiers sont appelés **KIR** (**K**iller-cell **I**g-like **R**eceptor) **inhibiteurs**, ILT2/LIR1 (Ig-like Transcript 2 ou Leukocyte Ig-like Receptor 1), LAIR1 (Leukocyte Associated Ig-like Receptor 1) et le récepteur orphelin p75/AIRM1(Adhesion Inhibitory Receptor Molecule-1). Les KIR inhibiteurs possèdent deux ou trois domaines de type Ig dans leur partie extracellulaire (2D ou 3D) et une longue queue intracytoplasmique (KIR-L, L pour "Long"). Il existe 8 KIR inhibiteurs différents, dont la nouvelle nomenclature CD (juillet 2001) est donnée pour information dans le tableau ci-dessous.*

Nomenclature CD pour les récepteurs KIR inhibiteurs et activateurs.

Récepteur KIR	*Nomenclature CD*
KIR2DL1	*CD158a*
KIR2DL2	*CD158b1*
KIR2DL3	*CD158b2*
KIR2DS6	*CD158c*
KIR2DL4	*CD158d*
KIR3DL1	*CD158e1*
KIR3DS1	*CD158e2*
KIR2DL5	*CD158f*
KIR2DS5	*CD158g*
KIR2DS1	*CD158h*
KIR2DS4	*CD158i*
KIR2DS2	*CD158j*
KIR3DL2	*CD158k*
KIR3DL7	*CD158z*

La reconnaissance de HLA classe I par ces récepteurs est dite " dégénérée " en ce sens qu'ils reconnaissent individuellement plusieurs allèles HLA.

Les KIR à 2 domaines sont spécialisées dans la reconnaissance des molécules HLA-C (et HLA-G). KIR2DL1 reconnaît les molécules HLA-Cw2/4/5/6/15/1602/1701, tandis que KIR2DL2 et 2DL3 reconnaissent HLA-Cw1/3/7/8/12/13/14/1601/1603. Le ligand de KIR2DL4 est HLA-G, une molécule du CMH de classe I non classique, celui de KIR2DL5 n'est pas connu. La présence de l'un quelconque de ces allèles du CMH protège de l'action d'une cellule NK.

*Les KIR à 3 domaines sont spécialisés dans la reconnaissance des molécules HLA-A et HLA-B. KIR3DL1 interagit avec de nombreuses molécules HLA-B (supertypie Bw*04 qui représente 1/3 des allèles), et KIR3DL2 pourrait reconnaître certains allèles HLA-A (e.g. A*03 and A*011). La liaison du KIR au CMH requiert une molécule de classe I en conformation normale; c'est-à-dire associée à la 92-microglobuline et chargée par un peptide, dont la nature ne semble pas avoir d'influence.*

De par son interaction directe avec les domaines α3 du CMH de classe I, ILT2/LIR1 (CD85j) est un récepteur de basse affinité avec une spécificité élargie à de nombreuses molécules (HLA-A, HLA-B, HLA-C et HLA-G).

Les récepteurs inhibiteurs appartenant à la **superfamille des lectines dimériques de type C.** sont représentés par les hétérodimères CD94/NKG2A (CD159a) (NKG2B est issu de l'épissage alternatif de NKG2A), qui ont pour ligand une molécule du CMH de classe I non classique : HLA-E.

Les lectines de type C sont des glycoprotéines transmembranaires de type II (extrémité N-terminale intra-cytoplasmique et C-terminale extra-cytoplasmique). A leur extrémité C-terminale se trouve un domaine de type CRO ("carbohydrate recognition domain") nécessitant la présence de Ca^{++} pour se lier au sucre spécifiquement reconnu.

Chez l'homme on a identifié quatre récepteurs de ce type sur les cellules NK qui ont tous leurs gènes codés sur le chromosome 12 : la molécule NKR-P1 A ou CD161, le CD69, le CD94 (ou kp 43) et les molécules NKG2 (A, C, D et E). La molécule CD94 est dépourvue de domaine ITIM et forme un hétérodimère avec un représentant de la famille NKG2 (A ou B) qui lui en possède deux. Cet hétérodimère CD94/NKG2 reconnaît entre autre la spécificité sérologique supertypique HLA-Bw6 (les 2/3 restant des allèles B, autres que Bw4).

L'inhibition, partagée par ces différents récepteurs sur la cellule NK, de l'activation des programmes de cytotoxicité cellulaire et de sécrétion de cytokines, repose sur l'existence, dans leur partie intra-cytoplasmique longue, d'un ou deux **motifs ITIM** (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) défini par la séquence consensus I/V/L/SxYxxL/V.

La phosphorylation des tyrosines du ou des ITIM après engagement du récepteur permet le recrutement de protéines tyrosine phosphatases à domaine SH2 : les protéines SHP-1 et/ou SHP-2. Celles-ci vont pouvoir, par leur activité phosphatase, inhiber la cascade de signalisation induite par des récepteurs activateurs associés à une activité tyrosine kinase (voir cours sur immunorécepteurs).

III - 3 - 2 - Récepteurs activateurs

Le **CD16** (récepteur de faible affinité pour le Fc des IgG) est le récepteur activateur de la cytotoxicité dépendante des anticorps des cellules NK (**ADCC**).

De nombreuses molécules, exprimées de manière non spécifique à la surface des cellules NK, sont impliquées *in vitro* dans l'activation de la cytotoxicité naturelle, comme molécules de co-stimulation.

Citons : CD2, NKR–P1(NK Receptor-Protein 1, CD161), CD40L, 2B4 (CD244), DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1), Lag3 (Lymphocyte Activation Gene 3), CD44, CD69, CD38.

Il existe des **KIR activateurs** , qui se différencient des KIR inhibiteurs par une partie intracytoplasmique très courte (KIR-S, S pour "Short"), ne possédant pas de motifs ITIM.

La nomenclature des KIR-S est proche de celle des KIR-L et répond à l'existence d'une homologie très importante dans leur partie extra-cellulaire (voir tableau). L'affinité du KIR-S pour son ligand HLA pourrait être modifiée, donc augmentée dans certains cas, par le peptide antigénique. Si les récepteurs activateurs ont une réelle fonction cela implique que dans certaines conditions, peptide antigénique particulier ou autre, le signal activateur " surpasse " l'inhibition.

Par contre, pour les récepteurs de type lectine, CD94/NKG2C la contre-partie activatrice de CD94/NKG2A, partage le même ligand : HLA-E. Le degré d'homologie entre NKG2A et C est de plus de 90% au niveau de la région extra-cellulaire.

Récemment ont été identifiés de nouveaux récepteurs activateurs, appelés **NCR** (Natural Cytotoxicity Receptors). Trois NCR appartenant à la superfamille des Ig, ont été décrits : NKp46, NKp44 et NKp30. Leurs ligands ne sont pas encore clairement définis.

Tous ces récepteurs activateurs (NCR et NKR) possèdent une partie intracytoplasmique trop courte pour leur permettre la transduction d'un signal. Ils sont donc obligatoirement associés, grâce à la présence d'un acide aminé chargé dans leur région transmembranaire, à des **polypeptides transmembranaires** spécialisés dans la **transduction** de signaux activateurs. Ces polypeptides possèdent un ou plusieurs motifs **ITAM** (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) dans leur partie intracytoplasmique.

Ce motif est défini par un enchaînement YxxL/I $(x)_{6-8}$ YxxL/I qui est phosphorylé sur les résidus tyrosine après engagement de ces récepteurs. Les tyrosines phosphorylées permettent le recrutement de protéines tyrosine kinases à domaines SH2, telles que ZAP-70 ou $p72^{syk}$. L'activation de ces protéines tyrosine kinases va initier la cascade de transduction du signal en aval de ces récepteurs (voir cours immunorécepteurs).

Trois polypeptides à ITAM différents sont associés à ces récepteurs: **CD3ζ, FcRγ** et **KARAP** (Killer cell Activating Receptor-Associated Protein) / **DAP12**.

Le premier est associé à NKp46 et NKp30, alors que le second n'est associé qu'à NKp46 et CD16. KARAP/DAP12, est associé aux KIR-S, CD94/NKG2C et NKp44 chez l'homme.

***NKG2D,** qui est un récepteur activateur de la famille des lectines chez l'homme et la souris, s'associe également à un polypeptide homodimérique transmembranaire. Ce polypeptide est appelé **DAP10**. Il ne possède pas de motif ITAM, mais un site de recrutement pour la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Les ligands de ce récepteur sont des protéines inductibles par le stress appelées MICA et MICB (MHC class I chain-related A et B) chez l'homme. Les gènes codant pour MICA et MICB sont polymorphiques et localisés dans la région du CMH sur le chromosome 6. Leur expression est liée à un " stress " cellulaire comme par exemple, un stress thermique, une infection virale ou une transformation tumorale*

III - 4 - Implications des cellules NK dans la réponse immunitaire

Des arguments *in vivo* et *in vitro* suggèrent l'implication des cellules NK dans **l'immunité anti-infectieuse**, dans **l'immunité anti-tumorale** et dans les **pathologies auto-immunes**.

Les souris RAG (Recombinase Activating Gene) déficientes, donc dépourvues de lymphocytes T et B peuvent contrôler l'infection à Listeria monocytogenes par le biais d'une production d'IFNγ par les cellules NK qui permet l'activation des macrophages infestés. La description chez l'homme d'infections sévères et récidivantes à virus du groupe Herpès chez de rares individus ayant un déficit complet et/ou fonctionnel en cellules NK témoigne de leur importance dans le contrôle de certaines infections virales in vivo.

Les cellules NK seraient impliquées dans la physiopathologie de certaines affections auto-immunes. Dans l'étude du modèle animal de l'encéphalite expérimentale auto-immune, elles ont un rôle protecteur en contrôlant négativement la réponse cellulaire T_H1 responsable de la survenue des lésions du système nervaux central.

Les cellules NK ont été initialement définies in vitro par leur cytotoxicité vis-à-vis de nombreuses lignées tumorales. De nombreuses tumeurs se caractérisent par une perte d'expression des molécules du CMH de classe I, expliquant le rôle d'immunosurveillance des cellules NK. Cette constatation est à la base de l'utilisation thérapeutique de l'IL-2 : l'effet LAK (Lymphokine Activated Killer) anti-tumoral induit par l'administration d'IL-2 est en partie lié aux cellules NK.

La cytotoxicité des cellules NK peut s'exercer aussi sur des cibles tumorales CMH classe I positives. Le signal inhibiteur peut donc être dépassé par le signal activateur devant certaines cibles cellulaires. Cette balance entre signal inhibiteur et activateur permet aux cellules NK la reconnaissance du caractère normal (" non stressé ") ou anormal (" stressé ") d'une cellule.

IV - LES CELLULES NKT

Les cellules NKT sont des lymphocytes T particuliers, qui partagent certaines caractéristiques avec les cellules Natural Killer (NK). Comme tout lymphocyte T elles expriment un **TCR**, avec cependant une utilisation biaisée de certains gènes variables (Vβ11 et Vα24JαQ) associée à une restriction de présentation particulière par les **molécules CD1d**. La nature de l'antigène présenté est **glycolipidique** : un puissant stimulant est ainsi un α-galactosylcéramide, retrouvé dans certains tissus, notamment nerveux.

Elles se retrouvent aussi bien dans la population de lymphocytes T $CD4^+$, que dans celle des lymphocytes T double négatif (DN) $CD4^-CD8^-$. Elles expriment les marqueurs NKR-P1 et CD122 des cellules NK. Elles se caractérisent par une forte production d'**IL-4** et d'**IFN**γ après activation.

Leur distribution chez l'homme est imparfaitement connue : elles représenteraient 5 % des lymphocytes intra-hépatiques et 0,1 à 0,5 % des lymphocytes sanguins circulants.

Leur maturation est vraisemblablement thymique.

Par leur production de cytokines, elles interviendraient dans la balance Th1/Th2.

*Certains auteurs y voient la source majeure d'IL-4 pour la différenciation en lymphocytes T CD4+TH2 à partir des précurseurs TH0. A un stade plus tardif, les cellules NKT inhiberaient la réponse TH1 par leurs cytokines, IL-4, IL-10 et TGF*β.

Leur rôle dans certaines réponses anti-infectieuses (Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes, Plasmodium), dans la survenue de pathologie auto-immune et dans la réponse anti-tumorale est l'objet des recherches actuelles.

V - LES CELLULES DENDRITIQUES

D'accessoires, les cellules décrites il y a plus d'un siècle par LANGHERANS, sont devenues dendritiques, en étant reconnues comme opérateur-clé dans la prise en charge des antigènes. Cette évolution a bénéficié des connaissances accumulées sur le système HLA et sur le paradigme TH1/TH2 qui ont eu valeur heuristique pour mieux caractériser la plasticité de ces cellules dont on sait maintenant qu'elles sont un lien indispensable entre les réponses immunitaires innée et adaptative, et un formidable espoir dans une stratégie de vaccination anti-tumorale.

V - 1 - INTRODUCTION

La première des cellules dendritiques a été décrite par Paul LANGERHANS *qui en 1868 observa pour la première fois, l'existence d'une population de cellules de morphologie irrégulière au sein de l'épiderme cutané. Ce n'est que dans les années 1970 que leur origine hématopoïétique a été démontrée et que le terme* ***cellule dendritique*** *(DC pour "dentritic cells") fut introduit par Ralph* STEINMAN *pour remplacer celui usité jusqu'alors de cellules dites* ***accessoires****.*

On savait que ces cellules étaient nécessaires à l'induction d'une ***réponse anticorps primaire*** in vitro*. Ces cellules accessoires avaient pour propriétés une forte mobilité, une faible activité endocytaire, une adhérence au plastique transitoire et une absence d'expression de récepteur au fragment Fc des Ig, et se caractérisaient par leurs longs prolongements cytoplasmiques (>10* μm*).*

L'étude des DC a longtemps souffert des difficultés à purifier convenablement cette population cellulaire minime du sang et des tissus (<1% de l'ensemble des cellules).

V - 2 - RÔLE DES CELLULES DENDRITIQUES

Les DC sont les cellules présentatrices d'antigène **(CPA) "professionnelles",** qui font le pont entre les composantes innée et adaptative de la réponse immunitaire.

Elles **seules** sont capables de **stimuler un lymphocyte T naïf**, car ce sont les seules CPA à exprimer, de manière constitutive, une forte densité de molécules de classe II du CMH et de molécules de costimulation.

Il existe plusieurs sous-populations de DC, que l'on retrouve sous deux états différents, **immatures,** quand elles capturent l'antigène**,** et **matures,** quand elles le présentent au lymphocyte T.

Les DC exercent aussi un rôle fondamental dans l'établissement de la **tolérance T**, tant centrale que périphérique.

On parle donc, en fonction de la morphologie, de **DC myéloïde**, et **de DC plasmocytoïde** ou **lymphoïde**, ou **DC2**. Les **DC myéloïdes** regroupent les **cellules de Langherans**, les **DC interstitielles** et les DC dérivée des monocytes ou **DC1**.

V - 3 - Distribution tissulaire des cellules dendritiques

L'activation des lymphocytes T naïfs ne peut se faire que dans des sites anatomiques privilégiés, les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses), où est assuré, au sein d'un microenvironnement propice, l'échange optimum d'information entre toutes les cellules immunocompétentes nécessaires à la mise en route d'une réponse immunitaire. Par définition les portes d'entrée des pathogènes sont situées le plus souvent dans les tissus non lymphoïdes, en dehors des sites d'initiation des réponses immunitaires T et B que sont les organes lymphoïdes.

Il est donc indispensable d'y amener l'information antigénique : la **migration** des DC y concourre.

Les **DC immatures** comprennent :

- les DC de l'**épiderme**, ou **cellules de Langerhans** :

Elles représentent 3 à 8 % des cellules de l'épiderme et se caractérisent par une morphologie très étirée, et la présence de granules de Birbeck, qui seraient des compartiments d'apprêtement. L'épiderme d'un homme adulte contient environ 10^9 cellules de Langerhans.

On retrouve dans les muqueuses des tractus digestifs, respiratoires et génitaux, des DC immatures ressemblant aux cellules de Langerhans.

- les DC dites **interstitielles**,

D'origine hématogène, elles colonisent, en très faible quantité (<1% de l'ensemble des cellules) tous les tissus non lymphoïdes, à l'exception de quelques organes dits de privilège immunologique comme la cornée centrale et le parenchyme cérébral.

- Les DC de la **lymphe afférente**

*où les DC, migrant des tissus aux ganglions, prennent la morphologie de **cellules voilées** ("veiled cells" en anglais)*

Dans le **sang**, les DC représentent **1 à 2 %** des cellules mononucléées : ce sont des précurseurs, monocytes et cellules pré-DC1 et pré-DC2.

Dans les organes lymphoïdes les DC comptent pour **0,5 à 2 %** des cellules : elles y ont été décrites sous le nom de **cellules inter-digitées**, et sont localisées dans les zones T (manchon périartériolaire de la rate, zone paracorticale des ganglions). Aussi bien des précurseurs (pré-DC2) que des DC matures peuvent y être observées.

Dans le **thymus**, les DC sont principalement localisées à la **jonction cortico-médullaire**, mais aussi dans la médullaire : elles y jouent un rôle crucial dans la **sélection négative** au cours de la différenciation T (voir cours spécifique).

V - 4 - L'origine de cellules dendritiques

Les DC prennent naissance dans la moelle osseuse, selon deux voies différentes, **myéloïde** et **lymphoïde**, à partir d'un précurseur commun **CD34**$^+$.

*A partir d'un précurseur **myéloïde** commun aux polynucléaires, macrophages et mégacaryocytes prennent naissance les DC interstitielles, les cellules de Langerhans et les monocytes (pré-DC1) capables de se différencier en DC1. Toutes ces cellules expriment le CD11c. Les monocytes et les DC interstitielles sont CD14$^+$, et les cellules de Langerhans et les monocytes sont CD1a$^+$. L'action de combinaisons différenciées de **GM-CSF**, **d'IL-4** et de **TGF**β explique le choix entre ces trois cellules.*

*A partir d'un précurseur **lymphoïde** commun aux lymphocytes T, B et aux cellules NK, les cellules **pré-DC2,** précédemment identifiées comme cellules fortes productrices d'IFN de type I dans le contexte d'une infection virale, sont capables de se différencier sous l'action principale de l'**IL-3**, d'une stimulation virale ou par l'engagement du CD40L.*

*Des boucles de **rétro-contrôle** existent entre les deux sous-populations DC1 et DC2 : les IFNα/β, porduits par les cellules DC2 sont capables d'inhiber la production d'IL-12 par les cellules DC1.*

V - 5 - Les deux sous-populations de cellules dendritiques

Les principales caractéristiques des cellules DC1 et DC2 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	DC1	**DC2**
Localisation	Tissus non lymphoïdes	Tissus lymphoïdes : zone T
Phagocytose/pinocytose	+++	+
Antigène stimulant	pathogènes	Antigène du soi (pathogènes par voie sanguine)
TLR	TLR-2 ; TLR-4	TLR-7 ; TLR-9
CD11c	+	-
CD14	+	-
CD1a	+	-
Cytokines produites	TNFα, IL-6; IL-12	IFNα, IFNβ

Leur fonction est de **tester l'antigène** dans les tissus, non lymphoïdes et lymphoïdes : si elles perçoivent des **signaux de danger**, elles le captent, l'apprêtent et migrent vers les ganglions lymphatiques où elles vont subir une maturation qui leur permet d'exercer pleinement leur fonction de CPA.

Les DC se caractérisent par une grande **plasticité** morphologique et fonctionnelle : elles sont capables d'orienter la réponse immunitaire en fonction des informations qu'elles perçoivent dans le micro-environnement. Selon la nature des cytokines, le rapport DC/lymphocyte T et l'état du pathogène, une même population de DC peut orienter la réponse T sur son versant TH1 ou TH2.

Ainsi les cellules DC1 stimulées par du LPS, des motifs CpG non méthylés d'ADN bactérien, du RNA viral double brin, du CD40L ou de l'IFNγ induisent une réponse TH1, alors que la stimulation des mêmes cellules par de l'IL-10, du TGFβ ou de la prostaglandine PGE2 entraine une réponse TH2. Pour ces mêmes cellules un rapport DC:lymphocytes T élevé amène une réponse Th1, alors qu'un rapport bas est synonyme de réponse TH2. Enfin dans la réponse à Candida albicans on a montré que le pathogène sous sa forme levure élicitait une réponse TH1, et une réponse TH2 sous sa forme filamenteuse.

V - 6 - LES FONCTIONS DES CELLULES DENDRITIQUES

Les fonctions de **capture** antigénique et de **présentation** antigénique sont **séparées** dans le temps et dans l'espace. Les DC immatures dans les tissus sont des sentinelles spécialisées dans la capture antigénique et l'apprêtement alors que les DC matures dans les zones T des organes lymphoïdes sont spécialisées dans la présentation de complexes CMH : peptide aux cellules T .

V - 6 - 1 - La fonction de capture des cellules dendritiques

Elle repose sur différents mécanismes :

- la **macropinocytose** qui permet de filtrer les liquides extra-cellulaires et de capturer les protéines solubles.
- l'**endocytose** qui suit la fixation des antigènes sur des récepteurs de type lectine
- la **phagocytose** de particules infectieuses ou non qui repose elle aussi sur la liaison à des récepteurs spécifiques
- enfin certains virus peuvent **infecter directement** les DC.

Après capture, les antigènes suivent la **voie exogène** de dégradation et d'apprêtement qui aboutit au chargement des molécules de classe II du CMH (voir cours HLA). En l'absence de signaux d'activation ou de danger, la majorité des molécules de classe II chargées est **intra-cellulaire** avec une demi-vie courte. L'**activation** des DC, qui déclenche leur **migration** et provoque leur **maturation**, se traduit par une redistribution **membranaire** des molécules de classe II chargées, dont la demi-vie allongée (>4 jours) permet une présentation ultérieure aux lymphocytes T.

V - 6 - 2 - La maturation et la migration des cellules dendritiques

Les pathogènes ou des molécules associées aux pathogènes induisent la **maturation** des DC qui s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels majeurs transformant de façon coordonnée et séquentielle une cellule capturant l'antigène en une cellule présentant l'antigène. La maturation est intimement liée à la migration des DC des tissus vers les organes lymphoïdes.

Les signaux capables d'induire la maturation des DC sont :

- Des molécules associées aux pathogènes (en anglais: Pathogen Association Molecular Pattern ou **PAMP**) comme le lipopolysaccharide (LPS), l'acide lipotéichoïque, l'ADN bactérien (motif CpG), ou l'ARN double brin (voir cours *immunité naturelle*) ;

- Des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL1, l'IL6, GM-CSF et l'IFNα, libérées dans le microenvironnement ;
- La molécule CD40L (CD154) exprimée par les cellules T $CD4^+$ activées ;
- La présence de cellules nécrotiques mais non apoptotiques ;
- Certaines molécules de choc thermique ou HSP (Heat shock proteins) exprimées par des microorganismes ou lors d'un stress cellulaire

Nous rappellerons le rôle des **récepteurs Toll-like** (TLR), au nombre de 9, chacun se liant à des ligands différents, qui permettent aux DC de décoder le micro-environnement dans lequel elle baigne, et d'y réagir en conséquence.

La **maturation** s'accompagne de:

- Une diminution considérable de la capacité des DC à capturer l'antigène ;
- Une augmentation de la quantité de molécules du CMH de classe II, et donc de complexe CMH-peptide, à la membrane
- Une augmentation de l'expression des molécules de CMH de classe I ;
- L'expression en grande quantité des molécules de costimulation CD80, CD86, CD40, et des molécules d'adhérence CD54, CD58.
- La production de cytokines : l'IL12 est produite largement par les DC sous l'influence de nombreux pathogènes et de certaines cytokines comme l'IFNγ ou l'IL4. Les cellules dendritiques peuvent également sécréter d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL1, l'IL6, l'IL15, l'IL18, et l'IL23 ;
- Une modification d'expression de récepteurs aux chimiokines
- Des modifications morphologiques importantes qui se traduisent par une diminution de l'adhérence, une augmentation de la mobilité et une réorganisation du cytosquelette avec apparition de longues dendrites très mobiles.

La migration des DC vers les organes lymphoïdes repose sur l'existence de récepteurs spécifiques pour des chimiokines (voir cours spécifique)

La panoplie des récepteurs est différente pour les DC immatures et matures, expliquant la migration.

	DC immature	*DC mature*
Récepteur de chimiokine	*CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1*	*CCR2, CCR7, CXCR1*
Chimiokine produite		*CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22*

Le MIP-3α (Macrophage inflammatory protein 3) est principalement exprimé par les tissus inflammés et permet le recrutement des DC immatures via les récepteurs CCR1 et CCR6. L'expression du CCR7 par les DC matures permet leur recrutement dans les organes lymphoïdes par deux chimiokines ligands de ce récepteur, MIP-3β ou CCL19 et SLC (secondary lymphoid tissue chemokine ou CCL21).

De plus, les DC matures sécrètent les chimiokines CCL22, CCL17, CCL18, CCL19 et CCL20 qui attirent les lymphocytes T ce qui favorise la rencontre dans les organes lymphoïdes entre les DC matures porteuses d'antigènes et leurs lymphocytes T spécifiques.

V - 6 - 3 - La fonction de présentation des cellules dendritiques

Rappelons que les DC sont **les seules CPA** capables **d'activer les lymphocytes T naïfs** *in vivo* et *in vitro*.

Bien qu'elles expriment 10 à 100 fois plus de complexes peptide/CMH que les autres CPA, le maintien d'un contact suffisamment long entre elles et le lymphocyte T

nécessite l'aide de nombreuses molécules d'adhérence qui participe à ce que l'on appelle la **synapse immunologique**.

On y retrouve des molécules appartenant à la famille des intégrines (LFA1, CD11b), à la superfamille des Ig (CD2, CD54/ICAM1, CD58/LFA3), et une lectine spécifique (DC-SIGN pour DC-specific intra-cellular adhesion molecule 3 grabbing nonintegrin) ligand de ICAM3.

*Les molécules de **co-stimulation**, responsables du signal 2 indispensable à l'activation du lymphocyte T, sont aussi retrouvées dans cette synapse : molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86), ligands du CD28.*

La communication entre DC et lymphocyte T va se faire dans le deux sens au niveau de cette synapse : par l'intermédiaire du CD40L, appartenant à la superfamille du TNF, le lymphocyte T est capacable de stimuler, via le CD40, de la famille du récepteur du TNF, la production de certaines cytokines par les DC, au premier rang desquelles l'IL-12. Celle-ci en retour est capable, selon le contexte, d'induire la différenciation T_H1, de provoquer la secrétion d'IFNγ par les cellules NK ou d'activer les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$.

Tableau 3 : molécules impliquées dans l'activation des lymphocytes T par les DC

Cellule dendritique	Lymphocyte T
CMH I/II	TCR
ICAM1	LFA1
DC-SIGN	ICAM3
LFA3	CD2
CD40	CD40L
B7-1 / B7-2	CD28

Ainsi, le rôle des DC pourraient être de décoder les signaux miroenvironnementaux et de traduire ces informations pour le lymphocyte T afin d'induire une réponse immune effectrice adaptée au type de pathogène. Il est possible que des sous-populations de CD soient apparues au cours de l'évolution pour lutter contre la diversité des agents pathogènes. En effet, les sous-populations de CD expriment des Toll-like récepteurs différents suggérant que chaque population soit spécialisée dans la reconnaissance de certains pathogènes.

V - 7 - Les cellules dendritiques à la frontière immunité innée/immunité acquise

Contrairement aux autres cellules effectrices, principalement phagocytaires, de la réponse immunitaire innée, qui meurent après avoir effectué leur fonction, les précurseurs immédiats des DC matures (monocytes et pré-DC2), qui ont un rôle effecteur dans cette réponse, anti-bactérienne et anti-virale respectivement, ont la capacité de se différencier en DC immatures puis matures, et ainsi d'initier la réponse T spécifique. Par la secrétion d'IL-12, elles sont capables d'activer les cellules NK. Par les molécules CD1, elles peuvent aussi présenter des glycolipides aux cellules NKT.

V - 8 - Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance des lymphocytes

Nous reverrons dans le cours sur la différenciation des lymphocytes T le rôle crucial des DC du thymus dans l'étape de **sélection négative** des thymocytes.

V - 9 - Implication des cellules dendritiques en immunologie clinique

*La meilleure connaissance de la physiologie des DC autorise des espoirs thérapeutiques, dont les plus avancés concernent la **réponse anti-tumorale** : l'utilisation de cellules dendritiques autologues, chargées de peptides tumoraux identifiés, est à l'essai chez l'homme pour augmenter une réponse cytotoxique déficiente.*

Ces traitements nécessiteront cependant de parfaitement définir le degré de maturation des sous-populations de DC utilisées, pour ne pas obtenir un effet tolérogène, à l'opposé de celui recherché.

VI - LES MACROPHAGES

Les macrophages sont des cellules qui font partie des premières lignes de défense de **l'immunité naturelle**, non spécifique. Dans ce cadre leur principale fonction, comme l'avait déjà démontré Elie Metchnikoff (1882) , est la **phagocytose,** d'agents infectieux, mais aussi de déchets autologues.

Comme les autres cellules de l'immunité naturelle, certaines de ses fonctions établissent un pont avec la réponse adaptative. Les **macrophages** constituent la forme tissulaire des **monocytes** dont le précurseur est commun dans la moelle osseuse avec celui des polynucléaires. Ce sont, comme les polynucléaires neutrophiles, des cellules douées de propriétés phagocytaires. Ils sont équipés de nombreuses enzymes lysosomiales à pouvoir bactéricide.

On décrit trois grandes fonctions aux macrophages :

- la **phagocytose**, suivie de la digestion de particules inertes, d'agents pathogènes ou de cellules (rôle d'éboueur)
- la **présentation** de **peptides** dérivés des antigènes ingérés au lymphocyte T pour initier une réponse immunitaire
- la **modulation** de cette **réponse immunitaire** par la sécrétion de médiateurs solubles (cytokines, chimiokines, prostaglandines)

Bien que capables de lyser à eux seuls certains microorganismes, les macrophages nécessitent parfois, en raison des mécanismes d'échappement développés par bon nombre d'agents pathogènes, qui leur permettent de survivre à l'état quiescent en intracellulaire (exemple : *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose) l'aide d'une sous-population particulière de lymphocytes T, les **lymphocytes T CD4 Th1**.

VI - 1 - origine et description des macrophages

VI - 1 - 1 - origine

Les macrophages ont été décrits en 1972 par Van Furth comme le système des **phagocytes mononucléés,** par opposition aux polynucléaires neutrophiles.

Ils prennent naissance dans la moelle osseuse à partir d'un précurseur commun myéloïde aux deux lignées, granulocytaire et monocytaire. Les facteurs de croissance et cytokines impliqués sont l'IL-3, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et le M-CSF (macrophage colony stimulating factor) encore appelé CSF-1 (voir cours hématopoïèse en Hématologie)

Le **monocyte sanguin** qui sort de la moelle osseuse est une cellule d'un diamètre de 10 à 20 µ, au noyau réniforme, au cytoplasme contenant des granulations azurophiles.

Rapidement cette cellule, après adhérence aux cellules endothéliales, est capable de passer dans les tissus où elle va subir des modifications morphologiques et phénotypiques qui lui confèrent un aspect particulier, identifié de longue date par les morphologistes, et reproduit dans le tableau suivant :

Appellation des phagocytes mononucléés selon les tissus

Organes / tissus	Phagocyte mononucléé
poumon	macrophage alvéolaire
séreuse	macrophage
os	ostéoclaste
foie	cellule de Küpffer
système nerveux central	cellule microgliale
rein	cellule mésangiale

VI - 1 - 2 - description

Il n'existe donc pas de morphologie typique, ni de marqueurs spécifiques partagés par tous les macrophages, et exclusifs de cette lignée.

Seule l'association de différents critères **phénotypiques** et **fonctionnels** permet d'assigner une nature macrophagique à une cellule (exemple : expression du CD14 par une cellule douée de phagocytose et de la capacité de sécréter après stimulation des cytokines inflammatoires).

VI- 2 - MARQUEURS MEMBRANAIRES DES MACROPHAGES ET CONTENU DES LYSOSOMES

Pour accomplir leurs différentes fonctions, les macrophages sont équipés de molécules membranaires qui leur permettent, dans un premier temps, de reconnaître directement (PRR) ou indirectement (RFc, CR) les particules à ingérer, de répondre à différents médiateurs (cytokines, molécules d'adhérence), de présenter des peptides. Les principaux sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Principaux marqueurs membranaires exprimés par les macrophages

fonction	Molécule membranaire	ligand
Reconnaissance directe par		
PRR (pathogen regognition receptor)	CD14	LPS/LBP
	TLR-2	peptidoglycan des bactéries Gram +
	TLR-4	LPS des bactéries Gram -
	Mannose fucose R (CD204)	glycoprotéines
	Scavenger R (CD204)	lipides
Reconnaissance indirecte par		
RFc	CD64 (RFcγI)	IgG
	CD32 (RFcγII)	IgG
	CD16 (RFcγIII)	IgG
	CD23 (RFcεII)	IgE
CR (complement receptor)	CR1 (CD35)	C3b
	CR3 (CD11b/CD18)	i C3b
	CR4 (CD11c/CD18)	i C3b
Communication/adhérence/apoptose		
apoptose	Fas (CD95)	Fas-L
	TNF-RI et TNF-RII	TNFα
adhérence	CD54 (ICAM-1)	LFA-1
	VLA-4 (CD49d/CD29)	Fibronectine, VCAM
communication	CD88 (C5aR)	C5a (chimiotaxie)
	Cytokines R	IL-1, -2, -3, -4, -6, -10, -13, IFNγ, TGFβ, GM-CSF, M-CSF
présentation		
	CMH classe I	CD8
	CMH classe II	CD4

Dans un deuxième temps, après l'ingestion des particules ou microorganismes et la formation d'un **phagosome**, ce dernier fusionne avec les lysosomes qui y déversent leur contenu. Ces derniers possèdent des mécanismes de défense oxygène- dépendants et oxygène indépendants comparables à ceux des polynucléaires neutrophiles (PNN) (cf infra).

VI - 3 - Fonctions des macrophages

VI - 3 - 1 - La phagocytose

Première fonction décrite des macrophages, elle est facilitée par les **opsonines** (RFc et CR) et les PRR. Elle s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène (**explosion oxydative**). Sauf à avoir développer des mécanismes de résistance, les micro-organismes sont tués et dégradés. Certains des produits de dégradation sont sélectionnés pour être présentés aux lymphocytes T.

VI - 3 - 2 - La présentation

Le macrophage **au repos** est une cellule qui exprime peu de molécules HLA de classe II et peu de molécules B7. L'ingestion de protéine soluble seule n'est pas capable d'augmenter suffisamment l'expression de co-signal B7 au-dessus du seuil de densité induisant l'activation du lymphocyte T. Dans ce contexte le macrophage n'accomplit que sa fonction d'éboueur vis-à-vis des débris cellulaires générés par les cellules de l'organisme en voie de sénescence sans, heureusement, activer les lymphocytes.

La situation est toute différente dans un contexte infectieux. Le macrophage est capable d'identifier un pathogène comme danger potentiel grâce à ses PRRs. Le même récepteur qui permet la fixation du microorganisme au macrophage et sa phagocytose entraîne aussi l'activation du macrophage et l'augmentation notamment de l'expression de la molécule B7 au-dessus du seuil d'activation du lymphocyte T. Le macrophage fonctionne donc comme une CPA efficace uniquement dans un **contexte infectieux**.

*Ceci explique le rôle d'**adjuvant** des bactéries. De nombreuses protéines étrangères, injectées seules à l'animal, n'induisent pas de réponse immunitaire, parce qu'elles sont incapables de délivrer un deuxième signal co-stimulateur sur les lymphocytes T. Mélangées à des bactéries inactivées, encore capables cependant d'induire l'activité costimulante des CPA, elles deviennent immunogènes.*

VI - 3 - 3 - Modulation de la réponse immunitaire

Par les cytokines et chimiokines qu'il produit après activation, le macrophage est capable d'agir sur lui-même et sur d'autres populations cellulaires (lymphocytes T, lymphocyte B, cellules NK).

Les principales cytokines produites sont les cytokines **pro-inflammatoires** (IL-1, IL-6 et TNFα) , les IFN de type 1 (α/β) mais aussi les IL-10, -12, -13, 15, et -18, des chimiokines. Nous renvoyons au cours sur les cytokines pour le détail des activités biologiques de ces médiateurs.

La résultante de l'action intégrée de ces médiateurs est de recruter dans le foyer inflammatoire l'ensemble des effecteurs cellulaires indispensables à l'élimination du pathogène envahisseur (voir chapitre *inflammation* dans le cours *"immunité naturelle"*).

En retour certaines de ces cellules (NK, lymphocyte T) par l'IFNγ qu'elles produisent activent le macrophage, et notamment augmentent l'expression membranaire des antigènes de classe II du CMH

VI - 3 - 4 - Cytotoxicité anticorps dépendante (ADCC)

Les macrophages sont aussi capables de participer à la réponse anti-tumorale, grâce au RFc pourvu que les tumeurs soient opsonisées par des anticorps spécificiques.

VII - LE POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE

VII - 1 - INTRODUCTION

*Les polynucléaires font partie des globules blancs (**leucocytes**) sont des cellules arrondies de 12 à 14 µ de diamètre : elles sont caractérisées par leur noyau polylobé et la présence de granulations cytoplasmiques, d'où leur nom de **granulocytes**. En fonction de la nature des granulations on distingue trois populations de polynucléaires : **neutrophile**, **basophile** et **éosinophile.***

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) jouent un rôle crucial dans l'immunité innée, car il constitue la première barrière de défense contre un pathogène invasif .

Pour ce faire, il s'appuie sur les effecteurs microbicides et cytotoxiques contenus dans ses granules. Sa mise en jeu se fait en 4 étapes :

- le **déplacement** du PNN vers sa cible
- l'**adhérence** à la cible
- la **phagocytose**
- les **mécanismes tueurs**, dont certains dépendent de l'oxygène (explosion oxydative) et d'autres non.

Par ailleurs, les PNN participent, dans un deuxième temps, à la mise en jeu de l'immunité acquise (ou adaptative), en libérant des **chimiokines** capables d'attirer les lymphocytes et les cellules dendritiques.

L'importance des PNN pour une réponse immunitaire (intégrant l'innée et l'adaptatif) efficace est illustrée par la survenue d'infections graves et/ou répétées dans certains déficits, comme dans la granulomatose septique familiale, touchant de façon élective le système de la NADPH-oxydase, impliquée dans les mécanismes tueurs oxygène-dépendant.

A l'inverse, une activation excessive, prolongée ou inapproprié, des PNN peut conduire à des lésions tissulaires sévères impliquées dans la physiopathologie de différentes maladies inflammatoires aiguës ou chroniques telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte (SDRA), la polyarthrite rhumatoïde ou certaines vascularites

VII - 2 - Origine et devenir des PNN.

Nous ne ferons que rappeler les étapes de la granulopoïèse, étudiée en Hématologie.

Les PNN sont issus, dans la moelle osseuse hématopoïètique, d'une cellule souche multipotente qui donnera naissance sous l'influence de différentes cytokines successivement à une cellule souche myéloïde, à un progéniteur mixte des granulocytes et des monocytes-macrophages, à un progéniteur de la lignée granuleuse qui se transforme en myéloblaste, puis en promyélocyte et myélocyte. Cette phase dite mitotique dure environ une semaine.

Elle est suivie de la phase post-mitotique, d'une durée sensiblement égale, au cours de laquelle le métamyélocyte se transforme en polynucléaire immature puis en polynucléaire mature. Au cours de cette maturation apparaissent successivement les granulations azurophiles (primaires) dans les promyélocytes, les granulations spécifiques (secondaires) qui définissent le type du polynucléaire, ici le neutrophile, dans les myélocytes. Les granulations contenant de la gélatinase apparaissent au stade de polynucléaires immatures.

Les polynucléaires matures restent au maximum cinq jours dans la moelle, constituant la réserve médullaire. La moelle produit environ 0,85 à 1,6x10^9 PN par kg et par jour chez un adulte dans des circonstances normales. Toute pathologie infectieuse est susceptible d'augmenter considérablement cette production

Le PN quitte la moelle et passe dans la circulation sanguine. Sa demi-vie y est brève, de 6 à 10 heures. Les PNN du sang se répartissent en cellules qui circulent dans les larges vaisseaux et les axes principaux des petits vaisseaux et d'autre part les leucocytes dits "marginés" (environ 50% du pool total). La numération formule sanguine quantifie les premiers, entre **1800** et **7000/µL** chez l'adulte. On parle de **neutropénie** pour un chiffre **inférieur à 1800/µL**, et de **polynucléose** pour un chiffre **supérieur à 7000/µL**.

Le PNN circulant dans le sang est une cellule quiescente (en phase G0 du cycle cellulaire). Il n'exprimera ses activités biologiques que dans les tissus, après y avoir été recruté sous l'influence de stimuli inflammatoire. En leur absence, il meurt spontanément par apoptose et est phagocyté par les macrophages résidants, évitant ainsi la libération de son contenu toxique.

VII- 3 - granulations des PNN.

Le PNN est une cellule compartimentée. Il est capable d'ajuster rapidement sa morphologie et sa physiologie aux variations de son microenvironnement. Il est équipé de

plusieurs types de **granules** et de **vésicules** différents par les molécules membranaires et matricielles qu'ils contiennent, dont l'empaquetage a lieu pendant la granulopoïèse. Leur mobilisation, strictement hiérarchisée explique les différentes étapes de la métamorphose du PNN depuis la cellule quiescente intra-vasculaire jusqu'au stade ultime du polynucléaire intra-tissulaire à activité métabolique et destructive maximale. On leur décrit ainsi des **granules azurophiles** (ou **primaire**, ou **alpha**), des **granules spécifiques** (ou **secondaires**, ou **neutrophiles**, ou **bêta**), des **granules de type gélatinase** et des **vésicules secrétoires**.

Le contenu de chacune est donné dans le tableau ci-dessous :

Contenu des granulations du polynucléaire neutrophile

azurophiles	**neutrophiles**	**gélatinase**	**Vésicules sécrétoires**
membrane	*membrane*	*membrane*	*membrane*
CD63, CD68	CR3, CD15, CD66, CD67	CR3	CR1, CD14, CD16
	Cytb558	Cytb558	Cytb558
	fMLP-R	fMLP-R	fMLP-R
	Rap1, Rap2		
matrice	*matrice*	*matrice*	*matrice*
Azurocidine	β2-microglobuline	β2-microglobuline	tétranectine
Protéinase 3	Collagénase		
Cathepsine G	gélatinase	gélatinase	
Elastase	Héparanase		
BPI	lactoferrine		
lysosyme	lysosyme	lysosyme	
Myéloperoxydase			
Défensines			
α-mannosidase			
Glycérophosphatase acide	Plasminogène activateur		
β-glucuronidase			
β-glycérophosphatase			
Sialidase	Sialidase		
N-acétyl-βglucosamidase	VitamineB12-binding protein		
α1-anti-trypsine			

Les marqueurs spécifiques de chaque type de granulations sont :

- la myéloperoxydase (**MPO**) pour les granules **primaires**
- la **lactoferrine** pour les **secondaires**
- la **gélatinase** pour les granules du même nom
- et le **CR1** membranaire pour les **vésicules sécrétoires**.

Au cours de l'activation du PNN, la mobilisation de ces granules aboutit à la fusion de leur membrane avec la membrane plasmique du PNN et à la libération de leur contenu. Ce phénomène est strictement hiérarchisé, allant des vésicules sécrétoires pour se terminer par les granules primaires. Sont ainsi d'abord exposés des récepteurs qui vont être impliqués dans la migration des PNN, puis seront libérés des enzymes permettant le passage trans-épithélial, avant que ne soient libérés les effecteurs microbicides et cytotoxiques contenus dans les granules secondaires et primaires.

VII - 4 - Migration tissulaire des PNN

Les PNN marginés roulent le long de la paroi des capillaires pour de simples raisons rhéologiques : leur rigidité, comparée à la plasticité des globules rouges ne leur permet pas de se faufiler dans des capillaires de taille inférieure à leur diamètre.

Le passage des PNN du sang vers un foyer inflammatoire tissulaire se fait en plusieurs étapes :

- **roulement** du PNN avec adhérence transitoire aux cellules endothéliales
- **adhérence** ferme et arrêt
- passage tissulaire ou **diapédèse**

VII - 4 - 1- roulement

Le contact qui s'établit avec les cellules endothéliales est transitoire. Il fait intervenir une première famille de molécules d'adhérence, les **sélectines**:

- L-sélectine, présente de façon constitutive sur la membrane plasmique des leucocytes
- E- et la P-sélectine, qui apparaissent à la surface des cellules endothéliales stimulées par un stimulus inflammatoire.

Les ligands respectifs sont donnés dans le tableau ci-dessous :

CELLULES ENDOTHÉLIALES	PNN
P-sélectine (CD62P)	PSGL-1 (P-selectine glycoprotein ligand-1)
E-sélectine (CD62E)	PSGL-1, ESGL-1 (E-selectine glycoprotein ligand-1)
CLA (cutaneous lymphocytic antigen)	L-sélectine (CD62L)

La P-sélectine apparaît en quelques minutes à la surface de l'endothélium stimulé par la thrombine, l'histamine ou des radicaux oxygénés, alors que la la E-sélectine n'apparaît que deux à trois heures après une stimulation par l'IL-1, le TNFα ou le LPS. La L-sélectine des leucocytes n'interviendrait qu'ultérieurement, dans la séquestration prolongée des neutrophiles dans les micro vaisseaux enflammés.

*La structure des sélectines est homologue. Ce sont des glycoprotéines membranaires avec une courte portion intra-cytoplasmique. Leur portion extra cellulaire comporte un domaine N-terminal de 120 AA présentant une homologie de structure avec les **lectines**. L'existence de nombreux AA chargés positivement explique la spécificité de liaison pour les polysaccharides anioniques (mannose 6 phosphate et dérivés) par ailleurs dépendante de la présence de **calcium**. Y fait suite un domaine de 33 AA ressemblant au facteur de croissance épidermique (**EGF** "epidermal growth factor"). Enfin la portion la plus proche de la membrane est composée de plusieurs domaines de 62 AA appelés **SCR** pour "short consensus repeat", constitués d'unités répétitives retrouvées dans les protéines régulatrices du complément se liant aux composants C3 et C4 (récepteur du complément CR1, CR2 ; C4bp ou C4 binding protein, DAF ou decay accelerating factor, facteur H, facteur I) mais aussi dans le récepteur de l'IL-2 et le facteur XIII de la coagulation (6 SCR pour la E-sélectine, 9 pour la P et 2 pour la L). Le rôle des SCR serait de maintenir à distance de la surface cellulaire les domaines lectines et EGF pour faciliter les interactions cellulaires.*

VII - 4 - 2 - arrêt

L'adhérence ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales se fait principalement par l'intermédiaire des β**2-intégrines**, hétérodimère αβ ayant en commun la chaîne β2, ou CD18 :

- CD11a/CD18 ou LFA-1 (Leucocyte Function assosiated Antigen-1),
- CD11b/CD18 ou Mac-1 ou CR3
- CD11c/CD18) ou CR4

Leur ligand principal est la molécule ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) sur les cellules endothéliales, molécule d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines dont l'expression est augmentée sur les cellules endothéliales en réponse aux cytokines pro-inflammatoires.

L'importance de la liaison des intégrines CD11/CD18 avec ICAM-1 est illustrée par l'observation des sujets ayant un déficit génétique en CD18 (Leukocyte adhesion deficiency, LAD), qui souffrent d'infections graves et répétées dues à un défaut de recrutement des polynucléaires dans les sites infectieux. Une situation semblable est observée chez les souris invalidées en ICAM-1.

Sur les polynucléaires circulants, les intégrines de la famille β2 sont sous une conformation qui n'a aucune affinité pour leurs ligands physiologiques. Lors de la stimulation des polynucléaires par différents stimuli comme des agents chimiotactiques (PAF, IL-8, fMLP, C5a), des cytokines ou facteurs de croissance (TNFα, GMCSF) ou des produits bactériens (formyl-peptides, LPS), des signaux intracellulaires déclenchent un changement de conformation des intégrines leucocytaires, qui acquièrent alors une forte affinité pour leur ligand.

L'engagement des intégrines avec leur ligand et leur regroupement membranaire déclenchent à leur tour des signaux intracellulaires, qui s'intègrent aux signaux délivrés simultanément par les cytokines ou agents chimiotactiques pour mettre en jeu différentes réponses cellulaires comme l'adhérence et la migration.

La migration orientée vers le site inflammatoire se fait sous l'influence d'un gradient de substances chimioattractantes provenant de la cible ou dont la production est induite par la cible. Durant la migration les PNN changent de forme et se " polarisent " dans le sens du gradient de substance chimioattractantes.

Les principales substances chimioattractantes sont les N-formyl-peptides dérivés des protéines bactériennes, le C5a, le leucotriène B4 (LTB4), le Platelet Activating Factor (PAF) et les chimiokines dont le prototype est l'IL-8 pour le PNN. Les facteurs chimioattractants se lient à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (serpentines) dont l'extrémité C-terminale est couplée à une protéine G héterotrimérique qui gouverne la transduction du signal.

Facteur chimioattractant	Récepteur sur le PNN
C5a	C5a-R
LTB4	LTB4-R
PAF	PAF-R
fMLP	FMLP-R
Il-18	CXCR1, CXCR2

Les mécanismes du mouvement sont complexes faisant intervenir les mouvements du Ca^{++} intracellulaire et de nombreuses voies de signalisation aboutissant au déclenchement de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine.

VII - 4 - 3 - passage tissulaire

Les PNN traversent l'endothélium au niveau des points de jonction de trois cellules endothéliales entre elles, points où on observe des discontinuités dans les jonctions serrées entre les cellules.

Cette transmigration est supportée par une interaction homotypique d'une molécule d'adhérence (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 ou PECAM-1 ou CD31) de la superfamille des immunoglobulines, exprimée à la fois à la surface du polynucléaire et à la jonction des cellules endothéliales.

Les PNN migrent à travers les tissus par haptotactisme, c'est-à-dire en répondant successivement à un gradient d'agents chimiotactiques produits par les bactéries, les cellules lésées, mais aussi par les cellules des tissus, activées in situ par des cytokines pro-inflammatoires ou par des produits bactériens comme le LPS. La progression du PNN est liée au fait que chaque agent chimiotactique désensibilise les récepteurs spécifiques du chimioattractant précédent. Pour cela, les intégrines à forte affinité à l'avant de la cellule sont internalisées lorsqu'elles se retrouvent à l'arrière au cours de la locomotion, pour être ensuite recyclées à l'avant. Le détachement des cellules peut aussi être favorisé par la concentration de molécules anti-adhésives, comme la leucosialine CD43, à l'arrière de la cellule.

La migration transépithéliale, lorsqu'elle est nécessaire au PNN pour atteindre le foyer de l'inflammation, se fait par l'intermédiaire des intégrines leucocytaires $\beta 2$.

Les principales molécules d'adhérence mises en jeu dans la migration des PNN son résumé dans le tableau ci-dessous (d'après L Mecarelli, cours 2001 de la SFI) :

Table 1: Molécules d'adhérence du polynucléaire neutrophile

Glycoprotéines membranaires du polynucléaire	Ligand	Fonction
L-sélectine (CD62L)	Groupement sialylLewis^x sur molécule non identifiée de la cellule endothéliale	Roulement sur l'endothélium
PSGL-1 (CD162)	P- et E-sélectines sur les cellules endothéliales	Roulement sur l'endothélium
ESL-1	E-sélectine sur les cellules endothéliales	Roulement sur l'endothélium
PECAM-1 (CD31)	PECAM-1 sur les cellules endothéliales	Traversée de l'endothélium
Intégrines β2 CD11a/CD18, CD11b/CD18 (CR3) CD11c/CD18	ICAM-1, ICAM-2 Fibrinogène iC3b autres ligands	Adhérence à l'endothélium Adhérence à la matrice extracellulaire Adhérence à l'épithélium Phagocytose
Intégrines β1 et β3		
α5β1(CD49e/CD29)	Fibronectine	Adhérence à la matrice extracellulaire
α6β1(CD49f/CD29)	Laminine	
αvβ3 (CD51/CD61)	Vitronectine	
CD44	Hyaluronate	Adhérence à la matrice extracellulaire

VI - 5 - Adhérence et phagocytose

Arrivés au contact de la cible, les PNN vont y adhérer directement grâce à des récepteur de MMAP ou indirectement par des récepteurs pour **opsonines**. Les principales opsonines sont des fragments du troisième composant du complément (C3), qui peut se déposer directement sur les parois des pathogènes (voir cours spécifique sur *le complément*) au cours de la réponse immédiate innée ou plus tardivement lors de la réponse spécifique sur des complexes immuns antigène-anticorps, et les immunoglobulines de classe G.

Les PNN expriment à leur membrane des récepteurs pour ces opsonines :

Récepteurs des opsonines du polynucléaire neutrophile

récepteur	**ligand**
CR1 (CD35)	C3b
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b
RFcγIIA (CD32)	IgG (préférentiellement IgG1 et IgG3)
RFcγIIIb (CD16)	IgG (préférentiellement IgG1 et IgG3)

La reconnaissance et l'adhérence à la cible sont le plus souvent suivies d'une phagocytose de la particule lorsque sa taille le permet, faisant inetervenir les mêmes éléments du cytosquelette qui participent au mouvement des PNN

VII - 6 - Fonctions tueuses et sécrétoires des PNN

Après l'englobement du pathogène et fusion du phagosome avec les lysosomes, le PNN fait appel à deux grands types de mécanismes pour l'éliminer :

- des mécanismes de dégranulation **indépendant de l'oxygène** conduisant au déversement de substances bactéricides dans le phagosome,
- la production de **formes réactives de l'oxygène** (FRO) par activation d'un système enzymatique, la NADPH oxydase.

VI - 6 - 1 - explosion oxydative (burst)

Grâce à la NADPH-oxydase, le PNN convertit l'oxygène en radical $O_2^{-\cdot}$ en présence de NADPH issu de la voie des hexoses monophosphates, selon la réaction :

$$NADPH + 2\ O_2 \rightarrow 2\ O_2^{-\cdot} + NADP^+ + H^+$$

L'ion superoxyde $O_2^{-\cdot}$ est transformé en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par dismutation spontanée ou sous l'action d'une superoxyde dismutase :

$$O_2^{-\cdot} + O_2^{-\cdot} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Par la réaction d'Haber-Weiss, l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent donner naissance au radical hydroxyle, composant hautement réactif.

Ces **FRO** (ion superoxyde O_2^{-}, radical hydroxyle $HO^{\cdot}$, H_2O_2) sont des composés extrêmement réactifs et capables d'oxyder protéines, nucléotides et lipides, mais à courte durée de vie.

La myéloperoxydase (MPO) contenue dans les granules azurophiles des polynucléaires, amplifie les effets toxiques de ces réactifs en les transformant en dérivés chlorés, acide hypochloreux (HOCl) et chloramines (R-NHCl), oxydants particulièrement toxiques car doués d'une longue durée de vie et pouvant être exportés à distance du site de leur formation :

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$$
$$H^+ + OCl^- + R\text{-}NH_2 \rightarrow R\text{-}NHCl + H_2O$$

La NADPH-oxydase est un complexe enzymatique formé de deux composants membranaires (p22phox et gp91phox), qui forment le cytochrome b558 présent sur la membrane plasmique et sur la membrane des granules spécifiques, de trois composants cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox), et de deux petites protéines liant le GTP, Rap1A, qui est membranaire et Rac2, cytoplasmique et complexée avec Rho-GDI. Le complexe est rassemblé lors de l'activation du PNN.

VII - 6 - 2 - système bactéricide indépendant de l'oxygène

Les enzymes contenues dans les granulations (voir tableau) sont déversées dans le phagosome. Certaines (hydrolases acides) nécessitent le PH acide intra-vacuolaire pour exercer pleinement leur activité.

Citons dans les granules secondaires (ou spécifiques) des protéines à activité antibiotique comme

- le lysozyme,

  c'est une enzyme de 14,4 kD, hydrolysant la liaison β1-4glycosidique entre le N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique du muropeptide des parois bactériennes. Il agit en synergie avec les protéases.
- la phospholipase A2,
- la lactoferrine
- la cathélicidine hCAP-18 qui donne naissance au peptide antibiotique LL-37. après protéolyse par l'élastase.

Dans les granules primaires, principaux réservoirs de protéines antibiotiques du polynucléaire, on retrouve :

- la BPI (bactericidal/permeability increasing protein), qui agit sur les bactéries Gram-négatif en liant fortement le LPS et en neutralisant son action;
- les protéases à sérine "serprocidines" analogues de l'élastase (cathepsine G, protéinase 3 et azurocidine), agissant sur les bactéries Gram-positif et Gram-négatif, les levures et les champignons ;
- la myéloperoxydase vu précédemment.

Mais les composants anti-bactériens les plus importants des granules azurophiles sont les **défensines**, qui constituent 30 à 50% du contenu de ces granules et 5 à 7% des protéines du PNN. Il s'agit de petits peptides antibiotiques de moins de 100 aminoacides, cationiques et présentant 6 cystéines fortement conservées qui forment trois ponts disulfures intrachaines.

On retrouve des peptides analogues chez la drosophile ou sur la peau de la grenouille Xenopus laevis, témoin du caractère ancestral de ce système de défense (voir cours sur l'immunité naturelle). Selon le type de pont disulfure, on distingue des α-défensines et des β-défensines. Quatre des six α-défensines identifiées à ce jour chez l'homme sont essentiellement synthétisées par les polynucléaires neutrophiles, d'où leur dénomination HNP-1 à HNP-4 (Human Neutrophil Peptide).

La structure en feuillets β amphiphile des défensines facilite vraisemblablement leur insertion dans les membranes bactériennes, qui perturberait l'intégrité et la perméabilité membranaire.

VII - 6 - 3 - Les défensines, relais de l'immunité innée vers l'immunité acquise.

Outre leur activité anti-infectieuse directe, les défensines et le fragment LL-37 de la cathelicidine hCAP-18 participent aussi à la mise en jeu de l'immunité spécifique par leurs propriétés chimiotactiques envers les cellules du système immunitaire.

Les défensines du neutrophiles attirent spécifiquement les lymphocytes T CD4 naïfs CD45RA, les cellules dendritiques immatures.

Le peptide LL-37 de la cathelicidine hCAP-18 des polynucléaires est, lui, chimiotactique pour les polynucléaires eux-mêmes, pour les monocytes et pour les lymphocytes T.

L'interaction peut passer par des récepteurs de chimiokines (CCR6, sur les cellules dendritiques immatures).

Ceci souligne les similarités entre les défensines et les chimiokines : taille d'environ 10 kDa, l'importance des ponts disulfures entre des cystéines fortement conservées et la charge cationique. Défensines et chimiokines serviraient ainsi de relais entre immunité innée et immunité acquise.

VII - 7 - Conséquences de l'activation du PNN

L'activation du PNN peut conduire à trois situations :

- mort de l'agent pathogène dégradé dans le phagosome
- mort du pathogène et mort du PNN lui-même, en cas d'insuffisance des mécanismes de protection (superoxyde dismutase, catalase, glutathion…) contre les FRO. Le PNN meurt par nécrose, constituant le **pus**.
- lésions des tissus environnants en cas de stimulation excessive ou inappropriée

VIII - MASTOCYTES, POLYNUCLÉAIRES BASOPHILES ET ÉOSINOPHILES

Ces trois types distincts de cellules partagent cependant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui justifient leur étude groupée. Longtemps considérés comme les "Cendrillons" de la réponse immunitaire et délaissées par les investigateurs, en raison de leur supposée seule implication "néfaste" dans les manifestations explosives de l'hypersensibilité, ces cellules voient leur rôle dans l'homéostasie de la réponse immunitaire actuellement réévalué à l'aune du progrès des connaissances sur la complexité de la réponse immunitaire naturelle.

VIII - 1 - Mastocytes

VIII - 1 - 1 - cytologie, origine et localisation tissulaire

En microscopie optique, les mastocytes, dont la taille varie de 10 à 20 µm, sont caractérisés par la présence de grosses granulations cytoplasmiques présentant le phénomène particulier de **métachromasie** (coloration rouge vif avec des colorants bleu).

Leur origine est médullaire, à partir d'un précurseur antérieur à celui de la lignée granulocytaire et sensible à l'IL-3 et au SCF (stem cell factor), ligand du *c-kit* ou CD117, exprimé à la surface des précurseurs.

Après un rapide passage sanguin, leur distribution est **tissulaire**.

Ils adhèrent aux composants de la matrice extra-cellulaire (laminine, fibronectine et vitronectine) grâce à des molécules de la famille des β1 intégrines ou CD29, appelées VLA-3, VLA-4 et VLA-5 selon la nature de la chaîne α (CD49c, d ou e).

Les granulations des mastocytes sont riches en protéoglycannes acides, responsables de la métachromasie. En fonction de leur nature, on distingue deux sous-populations de mastocytes, les mastocytes **muqueux** et les mastocytes **conjonctifs**.

Tableau : mastocytes muqueux et les mastocytes conjonctifs

caractéristiques	Mastocytes conjonctifs	Mastocytes muqueux
taille	10-20 µm	5-10 µm
protéoglycannes	héparine	chondroïtine sulfate
protéases	tryptase, chymase, carboxypeptidase, cathepsine G	tryptase
histamine	10-20 pg	1 pg

La différenciation de ses deux sous-population est vraisemblablement sous le contrôle de cytokines produites par différentes sous-populations de lymphocytes T dans les tissus en fonction de l'agresseur.

VIII - 1 - 2 - dégranulation

Les fonctions des mastocytes sont la résultante de la libération du contenu de leurs granulations.

Cette dégranulation est principalement la conséquence de la ligation d'un RFc spécifique, le **RFcεI,** récepteur de forte affinité (10^{-10} M) pour les IgE (voir cours *immunorécepteurs* et *immunoglobulines*).

On compte environ 3 x 10^5 RFcεI par mastocyte, armés par un monomère d'IgE, en attente de rencontrer leur antigène spécifique. La ligation par l'antigène active le mastocyte, aboutissant au relargage du contenu des granules.

D'autres récepteurs sont exprimés à la surface du mastocytes, dont certains peuvent être responsables d'une dégranulation IgE-indépendante, alors que d'autres permettent la maturation et la différenciation.

Tableau : récepteurs du mastocyte

récepteur	ligand
RFcεI	IgE
CD88	C5a : anaphylatoxine (dégranulation)
RFcγII (CD32)	IgG
RFcγIII CD16)	IgG
CD117 (c-kit)	SCF
CD124	IL-4
CD125	IL-5
CD154 (CD40L)	CD40

Les conséquences de la dégranulation sont la libération immédiate de médiateurs néoformés, amines vasoactives et enzymes protéolytiques, qui vont participer aux réactions **d'anaphylaxie** et **inflammatoire**, mais aussi à celle plus tardive (6 heures) de dérivés arachidoniques (prostaglandines et leucotriènes) résultants de la dégradation et de la libération des constituants des membranes des granules.

*L'**histamine** est formée in vivo par décarboxylation de l'histidine et stockée à la fois dans les mastocytes et les basophiles. Sa libération massive dans les chocs anaphylactiques est responsable d'une*

grande partie des signes cliniques observés. Son action est liée à l'activation des récepteurs H1, H2 et H3 cardiovasculaires et bronchiques. Elle est responsable d'une contraction des muscles lisses des voies respiratoires ou du tube digestif et d'une vasodilatation. L'histamine excrétée est rapidement métabolisée par deux voies enzymatiques, l'une dépendant de la N-méthyltransférase, l'autre de la diamine oxidase (histaminase).

*La **tryptase** est une sérine protéase neutre des mastocytes et représente près de 20% de leur contenu protéique. Contrairement à l'histamine, la tryptase est pratiquement absente des polynucléaires basophiles (<0.2% des protéines de la cellule). Il existe 2 isoformes de tryptase, la tryptase α et la tryptase β comprenant chacune plusieurs sous-types. La tryptase α est sécrétée en faible quantité de façon constitutive, alors que la tryptase β est normalement stockée dans les granules de sécrétion et n'est relarguée qu'après activation des mastocytes. La forme active de la tryptase est composée d'homotétramères α ou β, les formes monomériques étant inactives. Les propriétés biologiques de la tryptase sont encore mal définies. Elle augmente la perméabilité vasculaire, inhibe la coagulation en clivant les chaînes α et β du fibrinogène, active la fraction C3 du complément, et entraîne une hyperéactivité des cellules musculaires lisses des voies respiratoires.*

*L'α**-chymase** est une angiotensine convertase, qui clive l'angiotensine I en angiotensine II.*

Les mastocytes tissulaires sont localisés aux **interfaces muqueuses** de contact avec les pathogènes. Grâce à leur expression membranaire de certains récepteurs Toll-like (TLR1, 2 et 6) (voir cours *immunité naturelle*), ils sont capables de participer à la surveillance immunitaire contre les agressions bactériennes ou virales. Leur activation via ces PAMPs ou par des superantigènes capables de se lier aux IgE va conduire à la libération de cytokines (TNFα, IFNγ, IL-2, -3, -4, -5, -6, -13) ou de chimiokines (IL-8, -16, MIP-1α, -1β, MCP-1) régulant la réponse immunitaire.

VIII - 2 - POLYNUCLÉAIRES ÉOSINOPHILES

VIII - 2 - 1 - cytologie

Cellules de 12 à 13 µm, les polynucléaires éosinophiles (PNE) sont caractérisés par leur noyau bilobé et leurs granulations cytoplasmiques spécifiques colorées en orange par les anilines telles que l'éosine.

Physiologiquement leur nombre est inférieur à **500/mm^3** (0,5 x 10^9/L). On parle d'hyperéosinophilie pour un chiffre supérieur.

VIII - 2 - 2 - granulations

Comme les PNN, on leur décrit 4 types de granulations, caractérisées par leur contenu :

Tableau : contenu des granulations des polynucléaires éosinophiles

Granules primaires	***Granules spécifiques***	***Petites granulations***	***Corps lipidiques***
Cristaux de Charcot-Leyden : lysophospholipase	*MBP*	*NO synthétase*	*5- et 15-lipo-oxygénase*
	ECP	*ECP*	*Cyclo-oxygénase*
	EDN	*MMP9*	*Leucotriène C4*
	EPO	*Phosphatase alcaline*	*EPO*
	Lysozyme	*Collagénase*	*Synthase*
	Phosphatase acide	*Phosphatase acide*	*estérase*
	Arylsulfatase B	*Arylsulfatase B*	
	Catalase	*Catalase*	
	Enoyl-coA hydrase	*Histaminase*	
	Thiolase	*β-galactosidase*	
	β-glucuronidase	*β-hexosaminidase*	
	Cathepsine D	*α-mannosidase*	

	Elastase	*Elastase*	
	Phospholipase A2	*Cytochrome b*	
	BPI		

Les cristaux de Charcot-leyden sont spécifiques des PNE. Les petites granulations, riches en Arylsulfatase B, ne sont présentes que dans les PNE tissulaires. Les principales protéines sont des protéines basiques, telles que la MBP (Major Basic Protein), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin) et une peroxydase spécifique (EPO).

VIII - 2 - 3 - origine, localisation tissulaire

D'origine médullaire, les PNE se différencient au sein de la lignée granuleuse sous l'action principalement de **l'IL-5**.

Tout comme les mastocytes, après un bref passage sanguin de quelques heures, les PNE gagnent les tissus. On les retrouve principalement dans la peau et les territoires muqueux, volontiers dans les épithéliums. Leur migration repose sur la présence à leur surface de sélectines et d'intégrines qui ont déjà été décrites (CD62L, β2- et β1-intégrines).

VIII - 2 - 4 - récepteurs membranaires

Les PNE sont équipés de récepteurs pour des composants du complément, certains isotypes d'immunoglobulines et certains médiateurs et chimiokines.

Tableau : récepteurs des polynucléaires éosinophiles

nature	***récepteur***	***ligand***
complément	*C1q-R*	*C1q*
	CR1	*C3b*
	CR3	*C3bi*
	CR4	*C3bi*
	C3a-R	*C3a*
	C5a-R (CD88)	*C5a*
immunoglobulines	*CD23 (FCεRII)*	*IgE*
	CD32 (FCγRII)	*IgG*
	CD89 (FCαR)	*IgA*
Médiateurs et chimiokines	*fMLP-R*	*fMLP*
	LTB4-R	*LTB4*
	PAF-R	*PAF*
	CCR1	*MCP-1/CCL2*
	CCR3	*MCP-4*
	CXCR1	*IL-8*
	CXCR2	*IL-8*
	Eotaxine-R	*eotaxine*

L'**éotaxine** est le facteur **chimiotactique** le plus puissant pour les PNE.

VIII - 2 - 5 - fonctions des PNE

Les PNE sont des cellules **cytotoxiques** dont l'activité repose sur le contenu de leurs granulations. Leur activation peut être induite par des anticorps capables de se lier aux RFc ou par certains médiateurs.

Ce sont les agents principaux de la lutte contre certains parasites (helminthes). Ils participent aussi aux réactions anaphylactiques, et sont élevés dans certaines vascularites.

VIII - 3 - POLYNUCLÉAIRES BASOPHILES

Les polynucléaires basophiles (PNB) associent des propriétés des mastocytes et des PNE.

VIII - 3 - 1 - cytologie, origine et localisation tissulaire

Ce sont des cellules de 12 à 14 µm, dont le noyau polylobé est le plus souvent masqué par une quinzaine de grosses granulations présentant les mêmes propriétés de métachromasie que les mastocytes.

Chez l'adulte normal, leur nombre varie entre **10 à 200/mm^3** (0,01 à 0,2 x 10^9/L), représentant 0,5 à 1 % des leucocytes..

Leur origine est médullaire, distincte des mastocytes.

Des souris déficientes en mastocytes (W/Wv) ont des PNB.

Leur différenciation est sous l'influence du **GM-CSF** et de **l'IL-3.**

Le PNB qui sort de la moelle est une cellule mature, contrairement au mastocyte qui se différencie dans les tissus.

Leur localisation est principalement **sanguine**, mais leur passage tissulaire est désormais prouvé. Cette migration répond aux mêmes chimiokines que le PNE, et utilisent les mêmes intégrines et adressines.

Le contenu de leurs granulations spécifiques est identique à celui des mastocytes. Tout comme les PNE, leur granulations primaires contiennent des cristaux de Charcot-Leyden.

VIII - 3 - 2 - RFcεRI et dégranulation

Les PNB expriment des récepteurs, ou des marqueurs membranaires communs avec les deux autres types cellulaires.

Tableau : récepteurs des polynucléaires basophiles, éosinophiles et des mastocytes

Récepteur/marqueur	PNB	PNE	mastocyte
RFcεRI	+		+
IL-5R (CD125/CD131)	+		+
CD40L (CD154)	+		+
CD9	+	+	
CD15	+	+	
CD17	+	+	
CD63	+	+	
C5a-R (CD88)	+	+	+
RFcγRII (CD32)	+	+	+

L'activation, avec dégranulation conséquente, des PNB peut être consécutive à la ligation des IgE cytophiles ancrées sur le RFcεRI, ou à l'action directe de différents facteurs (C5a, chimiokines).

Les PNB jouent donc un rôle important dans les mécanismes de défense contre certains parasites (helminthes) et dans les réactions d'anaphylaxie IgE-dépendantes et indépendantes.

RÉSUMÉ

Les **lymphocytes** sont les cellules support de la réponse immunitaire adaptative. Grâce à un immunorécepteur membranaire unique (clonotypique) obtenu par mécanique recombinatoire, ils sont capable de reconnaître spécifiquement un antigène parmi des milliards de substances différentes. Selon la nature de l'immunorécepteur (BCR ou TCR) on distingue deux populations de lymphocytes, respectivement B ou T, qui supportent la réponse humorale, pour les lymphocytes B, et la réponse cellulaire pour les lymphocytes T. Le mode de reconnaissance de l'antigène est distinct : antigène natif en solution pour le BCR, antigène apprêté par une cellule présentatrice pour le TCR. La sélection clonale par l'antigène provoque l'expansion clonale : elle aboutit à des cellules mémoires et des cellules effectrices qui sont les plasmocytes pour la lignée B, et les lymphocytes cytotoxiques CD8 et les lymphocytes auxiliaires ou helper CD4 dont on distingue deux sous-populations TH1 et TH2 selon les cytokines produites. La fonctin des lymphocytes T est restreinte par leur capacité de liaison aux molécules présentatrices d'antigène que sont les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH classe I / CD8, CMH classe II / CD4).

Les **cellules Natural Killer** sont des lymphocytes dépourvus de récepteur spécifique pour l'antigène, contrairement aux lymphocytes T et B. Ils sont un des acteurs de la réponse immunitaire innée et exercent une cytotoxicité naturelle et/ou dépendante des anticorps. Il ont également une fonction essentielle de coopération cellulaire liée à la production de cytokines et de chémokines. Des récepteurs contrôlent étroitement leur activation. Les NKR sont des récepteurs inhibiteurs ou activateurs qui ont principalement comme ligands les molécules du CMH de classe I. Ainsi la lyse NK est inhibée si la cible cellulaire exprime des molécules de classe I. Les NCR sont des récepteurs activateurs de la cytotoxicité. Bien que tous les ligands ne soient pas encore clairement identifiés il a été montré que les récepteurs activateurs reconnaissent des molécules exprimées dans un contexte de stress cellulaire. Les cellules NK sont ainsi susceptibles de reconnaître et de détruire des cellules ayant subi une transformation tumorale ou virale. Cette propriété pourrait être utilisée dans des programmes de thérapie cellulaire chez l'homme.

Les **cellules dendritiques** sont des leucocytes spécialisés dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Ce sont des cellules rares que l'on retrouve dans tous les tissus de l'organisme et en plus grande quantité dans les zones T des organes lymphoïdes. Dans les tissus, les cellules dendritiques existent sous forme immature et sont des sentinelles spécialisées dans la capture antigènique et la détection des signaux de danger potentiel (infection, inflammation, nécrose). Ces signaux induisent la maturation des cellules dendritiques qui s'accompagne d'une augmentation considérable d'expression de molécules du CMH de classe II et de molécules de costimulation, et de la migration de ces cellules vers les zone T des organes lymphoïdes. Les cellules dendritiques matures ont alors l'unique propriété de pouvoir stimuler les cellules T naïves. Elles jouent donc un rôle central dans le contrôle de la réponse immune. De plus, l'existence de différentes sous-populations de cellules dendritiques aux fonctions spécifiques et l'extrême plasticité intrinsèque de chaque cellule dendritique leur permet de décoder les signaux microenvironnementaux potentiellement dangereux et de les traduire pour induire le type de réponse T adéquat. Les cellules dendritiques jouent également un rôle majeur dans la tolérance centrale et périphérique des cellules T. Ainsi, en l'absence d'inflammation ou d'infection, le rôle des cellules dendritiques tissulaires serait de maintenir la tolérance périphériques au soi. Il est désormais possible

d'obtenir ex vivo de grandes quantités de cellules dendritiques et leur utilisation dans des applications de vaccinations anti-tumorales suscite actuellement un grand intérêt.

Le **macrophage** à l'état basal est une cellule quiescente, ce qui prévient les risques d'agression inappropriée du voisinage. Son activation par les lymphocytes T $CD4^{+}$Th1 entraîne une augmentation de l'activité lytique vis-à-vis des germes intra-cellulaires par l'intermédiaire des radicaux libres d'oxygène, du monoxyde d'azote et des enzymes lysosomiales. De plus l'activation augmente ses capacités de CPA en augmentant l'expression des antigènes HLA de classe II et du TNF-R.

Les **polynucléaires neutrophiles humains** (PNN) sont une des premières barrières de défense contre l'introduction d'un agent pathogène dans l'organisme. Ils sont un des pivots de l'immunité innée. Ces cellules sont recrutées très rapidement du sang circulant vers un foyer infectieux et leurs fonctions effectrices sont également mises en oeuvre très rapidement grâce à la présence de molécules " prêtes à l'emploi " synthétisées durant la granulopoièse et stockées dans des compartiments différents, notamment les granulations, dans le PN au repos. L'interaction de l'agent pathogène et des médiateurs de l'inflammation avec les récepteurs présents à la surface des PN déclenche une activation rapide de leurs fonctions effectrices grâce à des phénomènes de décompartimentalisation. Les différentes étapes fonctionnelles conduisant à la bactéricidie sont notamment la production de formes réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase et l'utilisation de peptides antibiotiques. De plus, les PN sont capables de synthétiser *de novo* des protéines comme des cytokines pro- et anti-inflammatoires et sont eux-mêmes régulés par les différents médiateurs présents au niveau du foyer inflammatoire. Les PN interviennent donc par différents mécanismes dans l'élimination de l'agent pathogène, dans l'homéostasie tissulaire ainsi que dans la régulation des réponses immunitaires.

Les **mastocytes**, les **polynucléaires éosinophiles** et **basophiles** sont trois types distincts de cellules qui partagent cependant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui justifient leur étude groupée. Longtemps considérés comme les "Cendrillons" de la réponse immunitaire et délaissées par les investigateurs, en raison de leur supposée seule implication "néfaste" dans les manifestations explosives de l'hypersensibilité, ces cellules voient leur rôle dans l'homéostasie de la réponse immunitaire actuellement réévalué à l'aune du progrès des connaissances sur la complexité de la réponse immunitaire naturelle.

POUR EN SAVOIR PLUS

CHATENOUD L Lymphocytes T in BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 61-80

CHATENOUD L Lymphocytes B in BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 81-90

GENETET N lymphocytes in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 :17-40

JOSIEN R L Cellules dendritiques in BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 91-98

VOISINE C, TRINITE B, JOSIEN R L Cellules dendritiques *Revue Française des Laboratoires* , 2002, **327** : 31-42

SCHLEINITZ N, DIGNAT-GEORGE F, SAMPOL J, HARLE JR, VIVIER E Cellules natural killer *Revue Française des Laboratoires* , 2002, **327** : 23-30

GOUGEROT-POCIDALO MA Polynucléaires neutrophiles in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 :41-56

GOUGEROT-POCIDALO MA Polynucléaires neutrophiles humains *Revue Française des Laboratoires* , 2002, **327** : 23-30

WITKO-SARSAT V cellules phagocytaires in BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 98-107

CARON E, DORNAND J macrophages in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 :57-69

BENE MC, FAURE G Mastocytes, éosinophiles et basophiles in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 :71-88

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 17-34

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2001 : 137-154

TESTER-VOUS

1 - Un lymphocyte mature exprime à sa surface des molécules capables de reconnaître l'antigène

A - appelées immunoglobulines de surface pour le lymphocyte B
B - appelées TCR pour le lymphocyte T
C - de spécificité antigénique multiple pour un lymphocyte donné
D - obtenues après mécanique recombinatoire génétique
E - acquises, au contact de l'antigène, dans les organes lymphoïdes primaires

2 - Les principales cellules présentatrices d'antigène sont :

A - les polynucléaires basophiles
B - les monocytes/macrophages
C - les lymphocytes B
D - les lymphocytes T
E - les cellules dendritiques

3 - Les cellules sécrétant des immunoglobulines sont

A: les lymphocytes T
B: les plasmocytes
C: les polynucléaires basophiles
D: les cellules tueuses naturelles (NK pour "natural killer cells")
E: les lymphocytes B

4 - La molécule CD19 est un marqueur de surface spécifique :

A - des cellules tueuses naturelles ou NK ("natural killer cells")
B - des lymphocytes B
C - des lymphocytes T
D - des mastocytes
E - des monocytes:macrophages

5 - Le lymphocyte T

A - reconnaît l'antigène sous sa forme native
B - nécessite une cellule présentatrice d'antigène pour être activé par ce dernier
C - reconnaît l'antigène présenté par des antigènes HLA de classe I quand il est cytolytique
D - porte la molécule co-réceptrice CD8 quand il a une fonction "helper" (auxiliaire)
E - est éduqué dans la rate

6 - Les lymphocytes T cytotoxiques :

A - sont porteurs de l'antigène CD3
B - sont porteurs de l'antigène CD4
C - sont porteurs de l'antigène CD8
D - sont plus nombreux que les lymphocytes T auxiliaires ou "helper" dans le sang des

sujets sains
E - sont des composants de l'immunité naturelle

7 - Les propositions suivantes concernent le macrophage:

A - ils dérivent des monocytes sanguins circulants
B - ils sont les seules cellules présentatrices d'antigènes
C - ils sécrètent de nombreuses substances, dont certaines cytokines
D - ils possèdent des récepteurs pour des produits de dégradation du complément à leur surface
E - le processus de phagocytose, qu'ils exercent, est amélioré si l'antigène à capter est recouvert d'anticorps

8 - Les Cellules NK

A - sont issues de macrophages
B - représentent 10 à 15 % des lymphocytes circulants
C - expriment le marqueur CD16
D - sont restreintes par les antigènes du CMH
E - sont inhibées par les antigènes du CMH

9 - Les cellules NK :

A - existent avant toute immunisation
B - représentent environ 10 % des cellules circulantes du sang d'un adulte normal
C - sont munies de récepteurs pour le Fc des IgG
D - sont porteuses du marqueur CD56
E - sont absentes chez le nourrisson atteint du syndrome de DiGeorge

LES CYTOKINES

I - DÉFINITIONS ET NOMENCLATURE

I – 1 - DÉFINITIONS
I – 2 - NOMENCLATURE
I – 3 – IMPLICATIONS

II - PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES CYTOKINES

II – 1 - SÉCRÉTION
II – 2 - MODE D'ACTION

III - RÉCEPTEURS

III – 1- LES SIX FAMILLES DE RÉCEPTEURS

III – 1 – 1 - Classification

III – 1 – 1 – 1 – Récepteurs de cytokines de type I
III – 1 – 1 – 2 – Récepteurs de cytokines de type II
III – 1 – 1 – 3 – Récepteurs de cytokines de type III
III – 1 – 1 – 4 – Récepteurs de cytokines de type IV
III – 1 – 1 – 5 – Récepteurs des facteurs de croissance apparentés à la superfamillle des immunoglobulines
III – 1 – 1 – 6 – Récepteurs des chimiokines

III – 1 - 2 – Composition multimérique des récepteurs de cytokines

III – 1 – 3 – Redondance structurale et fonctionnelle

III- 2 – TRANSDUCTION DU SIGNAL

III – 2 – 1 – Tyrosine kinase
III – 2 – 2 - STAT
III – 2 – 3 – Autres voies de signalisation
III – 2 – 4 – Pléïotropie et spécificité d'action en fonction de la cellule cible
III – 2 – 5 – Régulation de la transcription

III – 3 – RÉCEPTEURS SOLUBLES ET RÉGULATION EXTRACELLULAIRE DES CYTOKINES

IV - CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES CYTOKINES

IV – 1 - GÉNÉRALITÉS
IV - 2 - LES CYTOKINES DES RÉPONSES IMMUNITAIRES
IV – 2 - 1 - Sous-populations de lymphocytes T CD4 Th1 et Th2.
IV – 2 – 1 – 1 - Description
IV – 2 – 1 – 2 – Différenciation Th1/Th2
IV – 2 – 1 - 3 - IL-2
IV - 2 – 1 – 4 - IL-9

IV - 4 – 1 - 5 - IL-15

IV - 2 - 2 - Immunité à médiation cellulaire

IV – 2 – 2 – 1- cytotoxicité cellulaire

IV – 2 – 2 – 1 – 1 - IFN γ ou de type II :

IV – 2 – 2 – 1 – 2 - IL-12:

IV – 2 – 2 - 1 – 3 - TNF

IV – 2 - 2 – 1 – 4 - La lymphotoxine : LT

IV – 2 – 2 - 1 – 5 - IL-18

IV – 2 – 2 – 2 - réponse macrophagique

IV – 2 – 2 – 2 – 1 - IL-1

IV – 2 – 2 – 2 – 2 - IL-6

IV – 2 – 2 – 2 - 3 - IL-11

IV – 2 – 2 – 2 – 4 - IL-17

IV – 2 – 3 - Immunité à médiation humorale

IV – 2 – 3 – 1 - IL-4

IV – 2 – 3 – 2 - IL-13 :

IV – 2 – 3 – 3 - IL-14 :

IV – 2 – 3 – 4 - IL-5

IV – 2 – 3 – 5 - IL-10

IV – 2 – 3 – 6 - TGF β

IV – 2 – 4 - Cytokines anti-virales

IV – 2 – 4 – 1 - Interférons de type 1

IV – 2 – 4 – 2 - IL-16

IV – 2 – 5 - Chimiokines

IV – 2 – 6 - Cytokines stimulant l'hématopoïèse

IV – 2 – 6 – 1 - L'érythropoiétine

IV – 2 – 6 – 2 - IL-3 ou multi CSF

IV – 2 – 6 – 3 - Le GM-CSF

IV – 2 – 6 – 4 - M-CSF

IV – 2 – 6 – 5 - G-CSF

IV – 2 – 6 – 6 - L'IL-7

CYTOKINES : OBJECTIFS

Niveau A :
- **définition**
- **non spécifique d'antigène**
- **pléïomorphisme**
- **redondance**
- **mode d'action : autocrine, paracrine, endocrine**
- **énumérer les six familles de récepteurs**
- **connaître les molécules de signalisation : Jak, STAT**
- **TH1/TH2 : définition, rôle respectif de l'IL-12 et de l'IL-4 dans la différenciation**
- **Connaître les différentes interventions des cytokines : réponse immunitaire, inflammation, réponse anti-virale, hématopoïèse et migration cellulaire**

Niveau B :
- **nomenclature**
- **connaître les grandes lignes de la structure des récepteurs**
- **connaître les grandes lignes de la signalisation**
- **grands principes de la régulation de la signalisation**
- **savoir situer les cytokines selon leurs effets biologiques pour les principales (IL-1, 2, -4, -5, -6, -8, 10, -12, -13, -15, TNF, IFN)**

I. DÉFINITIONS ET NOMENCLATURE

I – 1 - DÉFINITIONS

Le développement et le fonctionnement de tous les systèmes biologiques nécessitent une communication intercellulaire qui repose le plus souvent soit sur des contacts directs et spécifiques entre différentes sous-populations cellulaires, soit sur l'action de médiateurs solubles. Les cytokines sont de tels petits médiateurs solubles, dont l'intervention est indispensable aux réponses immunitaire, inflammatoire, à l'hématopoïèse, mais également à d'autres systèmes : neurologie, endocrinien, développement embryonnaire.

Les réponses immunitaires naturelle et spécifique, aussi bien dans leur branche afférente inductrice qu'efférente effectrice, sont en partie régulées par les **cytokines**.

Ces cytokines sont de nature protéique, glycosylées le plus souvent, et leur synthèse est inductible. Elles agissent dans un très court rayon d'action autour de la cellule qui les synthétise et les excrète. Elles activent ou modifient le comportement des cellules-cible après interaction avec des récepteurs de surface spécifiques.

Ce sont des médiateurs **non spécifiques de l'antigène** qui peuvent avoir une ou plusieurs sources cellulaires et une ou plusieurs cibles.

Les deux propriétés fondamentales des cytokines sont la **redondance** et la **pléïotropie** (ou pléïomorphisme). Une même activité biologique peut être provoquée par des cytokines différentes dans une cellule donnée (redondance). Une cytokine donnée peut entraïner des activités biologiques variées sur sa cellule cible, ou agir sur des cellules cibles différentes (pléïotropie).

La redondance est illustrée par les modèles d'invalidation de gènes par recombinaison homologue (souris KO) : maintenant que sont connus les gènes de cytokines et de leurs récepteurs, de nombreuses souris KO ont été générées, et l'invalidation de seulement une minorité de gènes s'est révélée délétère pour les souris.

On parle de **lymphokines** lorsqu'elles sont uniquement produites par des lymphocytes, et de **monokines** en cas de production exclusive par les moncytes/macrophages. On les recense également sous le vocable d'**interleukine**, qui traduit leur fonction principale de support de la communication entre les différentes sous-populations de cellules immunocompétentes. A ce jour il existe 21 interleukines formellement identifiées et internationalement reconnues.

La désignation actuelle de **cytokine** est encore plus générale sachant que certaines substances sont issues de cellules non leucocytaires comme des fibroblastes, des cellules endothéliales et que le mot cytokine recouvre tout cet ensemble.

I – 2 - NOMENCLATURE

Lors de conférences de consensus les experts internationaux, réunis en comité de nomenclature, leur attribuent un numéro quand l'interleukine est bien caractérisée sur le plan biochimique et fonctionnelle, que son gène est cloné, et que la distribution cellulaire, tant des cellules productrices que des cellules-cible est clairement établie. Officiellement en 2002 nous en sommes à l'IL-21 ; officieusement à IL-23.

*Pour des raisons historiques, un certain nombre de cytokines dérogent à la règle commune et ont conservé leur dénomination initiale qui le plus souvent renvoie à leur fonction: c'est le cas des **interférons**, capable de bloquer une infection virale, de certains facteurs de croissance hématopïétique comme les **GM-CSF, M-CSF** et **G-CSF** (pour respectivement "Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor", "Macrophage-*

*Colony Stimulating Factor" et "Granulocyte-Colony Stimulating Factor") ou d'autres facteurs tels que le **TNF**9 et le **TGF**9 (pour " Transforming Growth Factor 9).*

I – 3 - IMPLICATIONS

Le problème majeur qui se pose actuellement en-dehors de l'étude très précise de chacune des cytokines est celui de leur rôle *in vivo*, bien difficile à définir, car elles agissent en général de manière intriquée, se stimulant ou se freinant les unes les autres.

L'étude des effets in vivo des diverses cytokines est complexe car l'injection d'une cytokine même très pure de type recombinant déclenche une cascade d'autres médiateurs et donc des effets systémiques. Nous verrons que les systèmes de régulation reposent principalement sur des voies de rétroaction, mais également sur l'existence de récepteurs solubles capables de moduler positivement ou négativement l'activité de leurs ligands cytokiniques.

On administre aussi pour ce type d'étude des anticorps dirigés contre telle ou telle cytokine, notamment des anticorps monoclonaux.

On se sert d'animaux transgéniques ou d'animaux génétiquement invalidés (knock-out) où manque seulement dans leur génome le gène gouvernant la synthèse de telle ou telle cytokine, ou de leur récepteur.

Se pose également la question des applications thérapeutiques éventuelles : déjà réalisées en ce qui concerne plusieurs facteurs de croissance, l'interféron γ, l'interleukine 2, mais aussi promesse déjà concrétisée de thérapie cellulaire...

II PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES CYTOKINES

II – 1- SÉCRÉTION

Ce sont des glycoprotéines de **faible poids moléculaire** (compris entre 8 et 50 kD).

Les cytokines sont produites pendant les phases effectrices de l'immunité naturelle et spécifique et servent à médier et réguler les réponses immunitaires et inflammatoires. Certaines jouent aussi un rôle très important en tant que facteur de croissance.

La sécrétion est brève ; elle se produit *de novo*, généralement à courte distance.

De nombreuses cytokines sont produites par plusieurs types de cellules : par exemple l'IL-6 est produite par les macrophages et les lymphocytes T.

Il faut insister sur le **pléiotropisme** c'est-à-dire les points d'impacts cellulaires et tissulaires multiples de nombre de cytokines.

Le pléïomorphisme d'action des cytokines est souvent la règle. L'action de la cytokine sur sa cellule cible est la résultante de plusieurs facteurs (état de différenciation de la cellule cible, disponibilité de co-facteurs dans le micro-environnement). Ceci explique que les effets globaux des cytokines peuvent parfois être contradictoires. Le pléïomorphisme d'action des cytokines explique aussi le degré d'intrication de leurs effets; certaines ont des effets synergiques, d'autres des effets antagonistes. Ces interactions peuvent s'expliquer soit par des actions directes sur une cellule cible commune, soit par rétrocontrôle, positif ou négatif, de leur production réciproque. Contrairement aux hormones dont le taux de sécrétion est continu, les cytokines ne sont pas produites par des cellules au repos. Leur synthèse nécessite un signal d'activation.

La deuxième propriété qui en découle est la **redondance** des cytokines : des cytokines différentes peuvent avoir des actions identiques. Ceci est particulièrement illustré par les effets des invalidations géniques chez la souris. Des souris KO pour des gènes de cytokines , ou de récepteurs de cytokines, peuvent être indemnes de tout dysfonctionnement immunitaire.

Les cytokines sont des médiateurs néoformés, qui nécessitent donc un délai de synthèse entre le signal d'activation, qui induit leur production, et leur excrétion.

De très rares cytokines (TNF, LT, Fas-L) sont des protéines membranaires, libérées sous forme soluble par l'action de protéases.

II – 2 - MODE D'ACTION

On décrit trois modes d'action aux cytokines:

- activité **autocrine**, lorsque la cytokine agit localement sur des cellules du même type que la cellule productrice
- activité **paracrine**, lorsque la cytokine agit localement sur un autre type cellulaire que la cellule productrice
- activité **endocrine**, lorsque la cytokine agit à distance sur sa cellule cible.

Leurs actions sont souvent redondantes.

Elles influencent souvent la synthèse d'autres cytokines : on parle de "**cascade**" des interleukines. On observe parfois qu'une combinaison de cytokines produit un effet plus important que la somme des effets de chacune d'elles, c'est-à-dire qu'il y a **synergie**, ou encore provoque une réponse qu'aucune des cytokines impliquées ne peut induire par elle-même.

III - RÉCEPTEURS

Les effets biologiques des cytokines sont fonction de leur liaison à des récepteurs spécifiques présents sur les cellules et à leur concentration obtenue dans le voisinage des cellules-cible. Celle-ci est augmentée par la fixation des cytokines à des protéines membranaires ou sériques, ou sur des protéines de la matrice extra-cellulaire. Cette adsorption permet une libération progressive, en tout point semblable à celle obtenue à partir d'une éponge : ceci permet de diminuer la dilution des cytokines dans le milieu, et d'augmenter leur durée d'action.

*Cette liaison des cytokines à leurs **récepteurs** spécifiques est de très forte affinité (Kd = 10^{-10} à 10^{-12} alors que dans la réaction Ag-Ac on observe des Kd de 10^{-7} à 10^{-8} et que la liaison HLA-peptide est relativement faible avec un Kd de l'ordre de 10^{-6}. Ceci explique que des quantités très faibles de cytokinessont opérationnelles.*

Les récepteurs de cytokines sont des complexes membranaires multiprotéiques constitués de plusieurs chaînes (deux à trois) : une chaîne 9 qui confère l'affinité et la spécificité de la liaison cytokine-récepteur, et une chaîne 9 (éventuellement 1) qui permet la transduction du signal, et qui dans certains cas peut être commune à plusieurs récepteurs de cytokines apparentées.

Cette transmission du signal se fait par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques de la famille **Jak**, qui en retour phosphorylent certaines chaînes des récepteurs sur des résidus tyrosine. Ces résidus phosphorylés servent de point d'ancrage aux domaines SH2 des molécules **STAT** (signal transducer and activator of transcription), qui pourront, après phosphorylation et dimérisation, être transloquées vers le noyau. Après reconnaissance de motifs spécifiques d'ADN, ces molécules STAT initieront la transcription des gènes cible.

La libération de certains récepteurs sous forme **soluble** peut être le témoin d'une **activation** (chaîne 9 du récepteur de l'IL-2 ou CD25), ou générer des **antagonistes** naturels (récepteur soluble du TNF), voire des **agonistes** (chaîne 9 du récepteur de l'IL-6).

III – 1- LES SIX FAMILLES DE RÉCEPTEURS

Pour une cytokine donnée l'expression de son récepteur spécifique sur différents types cellulaires est le plus souvent la règle et explique le **pléïomorphisme** de ses activités.

Les **récepteurs** des cytokines sont regroupés en **six** grandes familles.

III – 1 – 1 - Classification

III – 1 – 1 – 1 – Récepteurs de cytokines de type I

Encore appelés récepteurs des hématopoïétines, c'est de loin la famille qui compte le plus de membres. Toutes ces chaînes de récepteurs sont des glycoprotéines membranaire de type 1 (extrémité NH_2-terminale orientée vers l'extérieure).

*La portion extracellulaire est constituée de deux domaines d'environ 100 acides aminés. Le premier possède **4 résidus cystéine** engagés dans des ponts disulfures intra-domaine. Le second possède un motif **W-S-X-W-S** (tryptophane-sérine-acide aminé quelconque-tryptophane-sérine). Chaque domaine se compose de 7 feuillets β anti-parallèle.*

Les portions intracytoplasmiques sont de longueur variable (13 à 577 acides aminés) sans activité tyrosine kinase intrinsèque. Elles possèdent cependant à proximité de la membrane deux motifs appelés Box1 et Box2 dont le premier est un site riche en proline jouant un rôle important dans la transduction du signal.

Ces caractéristiques sont partagés par tous les récepteurs de cytokines cités dans la figure 2 : IL-2Rβ, IL-2Rγ, IL-3Rα, IL-3Rβ, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-12R, G-CSFR, GM-CSFR, TPOR, LIFR, OSMR, CNTFR, gp130, GHR, PRLR, EPOR.

Sur ce canevas commun existent des variations : duplication des motifs de base (chaîne β commune à l'IL-3R, l'IL-5R et le GM-CSFR) ; addition d'un motif immunoglobuline-like en NH_2-terminal seul (IL-6R) ou associé avec l'insertion entre le domaine W-S-X-W-S et la membrane plasmique de trois domaines de type fibronectine de type III (gp130, G-CSFR, IL-12R), domaines qui peuvent aussi se voir en association avec une duplication des motifs de base (LIFR).

*Enfin certains membres de cette famille ne possèdent pas de domaines transmembranaire et intracytoplasmique. Ils sont ancrés dans la membrane par une liaison de type **glycosyl-phosphoinositol (GPI)** : il s'agit de la chaîne α du CNTFR qui utilise le complexe gp130-gp190 pour transmettre son signal d'activation et de la molécule p40 qui s'associe à p35 pour former l'IL-12R.*

III – 1 – 1 – 2 – Récepteurs de cytokines de type II

Cette famille comprend les récepteurs des **interférons** (α, β et γ) et de l'IL-10.

*Ils partagent dans leur portion extracellulaire un domaine commun comprenant une paire de résidus **cystéine** à chaque extrémité. Ce domaine est dupliqué dans le cas du récepteur aux interférons α et β. Comme pour la famille précédente la portion intracytoplasmique de ces récepteurs n'a pas de propriété tyrosine kinase intrinsèque.*

III – 1 – 1 – 3 – Récepteurs de cytokines de type III

Les chefs de file de cette famille sont les deux sortes de récepteurs du **TNF** (p55 et p75) : on y retrouve le NGFR, mais aussi d'autres molécules membranaires impliquées dans la communication intercellulaire : CD40, CD30, CD27. L'architecture commune de base est faite de domaines riches en cystéine.

Parmi ces récepteurs on individualise un sous-groupe appelé **« death-receptors ».**

Ces récepteurs ont le pouvoir d'enclencher la mort programmée de la cellule par apoptose après fixation de leur ligand spécifique. Il s'agit du FasLR, des TNFR de type 1, du DR3 (ligand : APO3L), du DR4 et

du DR5 (tous deux ayant TRAIL comme ligand) et des récepteurs leurres (decoy receptor) DcR1, DcR2 et DcR3. Ces récepteurs possèdent dans leur portion intracytoplasmique des domaines de mort (death domain) couplant la transduction du signal à l'activation des caspases.

III – 1 – 1 – 4 – Récepteurs de cytokines de type IV

Il s'agit de récepteur pour **l'IL-1** (type 1 et 2, ce dernier étant un récepteur leurre, incapable de transmettre un signal), la chaîne accessoire de l'IL-1R (IL-1Racp), le récepteur de l'IL-18, et la molécule T1/ST2 dont le ligand n'est pas connu à ce jour.

*Ces récepteurs possèdent tous **trois domaines Ig-like** dans leur portion extracellulaire, mais sont dépourvus d'activité tyrosine kinase dans leur portion intracytoplasmique, ce qui les différencie du groupe suivant.*

Dans leur portion intracellulaire ces récepteurs présentent des homologies avec des récepteurs retrouvés d'abord chez la drosophile, puis chez l'homme. Chez la drosophile ils ont été initialement caractérisés par leur implication dans l'établissement de la polarité dorso-ventrale et ils sont appelés récepteurs **Toll**. Chez les mammifères, comme chez la drosophile, ils participent également à la signalisation des peptides anti-bactériens (défensines) : on parle de TLR (Toll like receptor, voir cours sur *immunité naturelle*).

III – 1 – 1 – 5 – Récepteurs des facteurs de croissance apparentés à la superfamillle des immunoglobulines

Ce sont les seuls récepteurs à posséder une **activité tyrosine kinase intrinsèque** dans leur portion intracytoplasmique. Ils sont regroupés sur la base de l'expression de **cinq domaines Ig-like** en extra-cellulaire. Ce sont le PDGFR, LM-CSFR, l'EGFR, le SCF (ou ligand de c-kit) et le ligand de flt3.

III – 1 – 1 – 6 – Récepteurs des chimiokines

Les chimiokines sont des petits médiateurs indispensables au traffic cellulaire. Elles se définissent par : a) leur poids moléculaire relativement faible (inférieur à 10 kD) ; b) la position des deux premières cystéines , soit adjacentes (**C-C chimiokines**,) soit séparées par un acide aminé quelconque (**C-X-C chimiokines**) qui permet d'identifier deux familles de chimiokines (C-C ou β, C-X-C ou α) dont les gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 4 ; c) la présence de sept jonctions transmembranaire dans leurs récepteurs couplés à une protéine G , qui permet la transduction du signal de type 9-adrénergique.

III – 1 - 2 – Composition multimérique des récepteurs de cytokines

Mis à part les membres de la famille des facteurs de croissance avec activité tyrosine kinase intrinsèque, qui forment des homodimères après fixation de leurs ligands, les autres récepteurs sont composés de deux à trois chaînes distinctes : une chaîne α qui est responsable de la spécificité de liaison, et une ou deux chaînes (β et γ) dépourvues de capacité de liaison intrinsèque à la cytokine, mais indispensable à la formation d'un récepteur de haute affinité et à la transduction du signal. Seuls dérogent à la règle les G-CSFR, EPOR, PRLR et GHR qui forment des homodimères.

III – 1 – 3 – Redondance structurale et fonctionnelle

La meilleure connaissance de la structure des récepteurs de cytokines permet de mieux appréhender la redondance fonctionnelle de ces dernières. Elle s'explique par le partage de chaîne commune entre différents récepteurs, responsables d'activités biologiques voisines et de compétition observée entre les cytokines.

Une **chaîne commune** β est ainsi partagée entre **l'IL-3R, l'IL-5R et le GM-CSFR**, qui possèdent chacun leur chaîne α spécifique.

Une **chaîne commune (gp130)** identifie le sous-groupe des récepteurs apparentés à **l'IL-6R** : on y retrouve les récepteurs de **l'IL-11**, de **CNTF**, du **LIF**, de l'**OSM**, qui résultent de l'association différente de cette chaîne avec des chaînes α spécifiques et une troisième chaîne (gp190).

Le troisième groupe est constitué par **l'IL-2R, l'IL-4R, l'IL-7R, l'IL-9R et l'IL-15R**. Tous ces récepteurs partagent une **chaîne γ commune (γ_c),** associée à leur chaîne α spécifique et à une chaîne β commune dans le cas des IL-2R et IL-15R.

L'absence de cette chaîne caractérise certains déficits immunitaires primitifs, qualifiés de déficits immunitaires combinés sévères (DICS ou SCID pour severe combined immunodeficiency) : ils sont retrouvés chez l'homme et chez la souris. L'IL-2 ou son récepteur, initialement suspecté d'être responsable de ces DICS ont été rapidement blanchis grâce à l'obtention de souris KO par recombinaison homologue : seules les souris KO $\gamma_c^{-/-}$ reproduisent ce phénotype, vraisemblablement par inactivation de l'IL-7R, expliquant le déficit en lymphocytes T. Nous verrons plus loin les applications thérapeutiques récentes de l'existence de ce partage de chaîne commune γ_c entre ces différents récepteurs de cytokines.

Le dernier exemple de partage de chaîne est celui qui existe entre les récepteurs des deux cytokines impliquées dans la réponse IgE : l'IL-4 et l'IL-13. L'IL-13R s'associe à la chaîne α de l'IL-4R pour former un récepteur de haute affinité pour l'IL-13.

III- 2 – TRANSDUCTION DU SIGNAL

III – 2 – 1 – Tyrosine kinase

La fixation d'une cytokine à son récepteur va aboutir *in fine* à la transcription d'un certain nombre de gènes et à la synthèse de protéines qui vont être responsables des activités biologiques de la cytokine.

Le passage du message de la membrane (récepteur) au noyau se fait par une cascade de phosphorylation de substrats intracytoplasmiques conduisant à des facteurs de transcription.

Pour les récepteurs avec activité tyrosine kinase intrinsèque, leur dimérisation et leur transphosphorylation sur des résidus tyrosine génèrent les sites d'ancrage (tyrosines phosphorylées) pour des molécules adaptatrices ou effectrices possédant un motif SH2, capables d'activer différentes voies de transduction du signal (ras-MAPkinases, PI3-kinase, PLCγ,….).

Pour les autres récepteurs, c'est-à-dire la majorité, ce sont les membres de la famille **JAK** (Janus kinase, ou Just Another Kinase, pur rappeler qu'elles ont été découverte avant que leur rôle ait été identifié) qui sont recrutés en premier. Ces kinases intracytoplasmiques sont au nombre de quatre : Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Leurs caractéristiques principales sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau : Famille JAK

	taille	chromosome (homme)	expression
Jak1	135 kD	1 p31.3	ubiquitaire
Jak2	130 kD	10 p23-p24	ubiquitaire
Jak3	120 kD	4 q31	myéloïde/lymphoïde
Tyk2	140 kD	19 p13.2	ubiquitaire

Elles possèdent deux domaines de type kinase, dont le seul fonctionnel est le plus carboxy-terminal et cinq zones d'homologie importante entre les différents membres (appelées A, B, C, D et E).

L'obtention de souris KO pour chacune des Jak, ou à l'inverse la transfection du gène d'une Jak à des lignées cellulaires déficientes en réponse à une cytokine, a permis de constater que chaque récepteur utilise spécifiquement une kinase. Ceci est résumé dans le tableau suivant.

Tableau : Association des JAK et des STAT avec les récepteurs de cytokines.

				JAK				STAT			
cytokines	**famille**	**Jak1**	**Jak2**	**Jak3**	**Tyk2**	**STAT1**	**STAT2**	**STAT3**	**STAT4**	**STAT5**	**STAT6**
EPO	classe I		x							x	
G-CSF	homodimères	x	x			x		x			
TPO			x			x		x		x	
PRL			x							x	
GH			x					x		x	
IL-2	classe I	x		x		x		x		x	
IL-4	hétérodimères	x		x							x
IL-7	famille γc	x		x		x		x			
IL-9		x		x	x	x		x			
IL-15		x		x				x		x	
IL-3	classe I		x							x	
IL-5	hétérodimères		x							x	x
GM-CSF	famille βc		x			x				x	
IL-6	classe I	x	x		x	x		x			
LIF	hétéromultimères	x	x		x	x		x			
OSM	famille gp130	x	x		x	x		x			
IL-11		x	x		x	x		x			
CNTF		x	x		x	x		x			
IL-12	classe I		x		x			x	x		
IL-13	classe I	x									x
IFNα/β	classe II	x			x	x	x				
IFNγ		x	x			x					
IL-10			x		x	x		x			

Le mode d'action des Jak n'est pas complètement établi. La fixation de la kinase au niveau de la Box 1 serait une étape indispensable après dimérisation ou oligomérisation des récepteurs induites par la fixation de la cytokine. Il s'en suivrait une auto-phosphorylation des Jak et une phosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs, générant des sites d'ancrage pour des molécules adaptatrices ou effectrices ayant des domaines SH2.

D'autres tyrosine kinases sont impliquées dans la transmission des signaux pour les récepteurs de cytokines. Ce sont surtout des membres de la famille SRC : Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr et Yrk.

III – 4 – 2- STAT

La résultante de l'activation des Jak est la phosphorylation sur un résidu tyrosine de facteur de transcription protéique appelés **STAT** (pour **Signal Transducers and Activators of Transcription**). Les STAT phosphorylés sont alors capables de s'associer sous forme d'homo- ou d'hétérodimères capables de se transloquer dans le noyau.

Là ils vont pouvoir se fixer sur des éléments GAS (Gamma Activated Sequences, car décrits la première fois pour le gène de l'IFNγ) dans le promoteur d'un certain nombre de gènes. Ces éléments GAS possèdent une structure palindromique générale : TT(N)sAA. Ces STAT sont au nombre de six.

Là encore la même approche expérimentale avec des souris KO en une STAT ou avec des lignées déficitaires transfectées a abouti à la conclusion que différentes STAT sont activés par différents récepteurs, mettant en jeu différentes Jak (voir tableau sus-jacent).

III – 2 – 3 – Autres voies de signalisation

D'autres voies de signalisation que les Jak et les STAT sont utilisées par les cytokines. Cela est notamment le cas pour les récepteurs de cytokines à activité kinase intrinsèque qui peuvent transduire le signal par la voie Ras-MAP kinase. Les voies de la PI3-

kinase, de la PLCγ peuvent aussi être mise à contribution pour la transduction du signal en fonction des cytokines.

III – 2 – 4 – Pléïotropie et spécificité d'action en fonction de la cellule cible

On voit donc que la multiplicité des voies de transduction du signal mis en jeu par la fixation d'une cytokine à son récepteur génère une certaine flexibilité et aboutit, selon les différents gènes activés, à des effets biologiques variés, au sein d'un même type cellulaire : signaux de prolifération, de différenciation, d'activation.

Le mystère que les immunologistes cherchent désormais à élucider est celui de la spécificité de la réponse en fonction de l'état de différenciation de la cellule-cible. Autrement dit, dans un modèle orchestral symphonique de différents interprètes cytoplasmiques (kinases et molécules adaptatrices), comment est exécutée la partition qui doit tenir compte de différents paramètres : différence d'affinité des sites GAS pour les divers dimères de STAT, disponibilité et nature des différentes STAT, interaction des STAT avec d'autres protéines qui pourraient modifier leur capacité de liaison à l'ADN, modulation par d'autres facteurs de transcription, etc…

III – 2 – 5 – Régulation de la transcription

Compte tenu de leur implication dans différentes réponses capitales (anti-bactériennes, anti-virales, inflammatoire), il est nécessaire que le signal transmis par les cytokines soit rigoureusement contrôlé dans le temps et dans l'espace.

Ce contrôle associe des mécanismes extracellulaires (cf infra) et intracellulaire. Les voies de signalisation sont effectivement sous la dépendance de divers systèmes de contrôle rétroactifs.

Le premier système repose sur l'action de tyrosine phosphatases, antagonistes des tyrosine kinases. La mieux caractérisée est l'**HCP** (**Hematopoïetic Cell Phosphatase**) qui, grâce à deux domaines contigus SH2 peut se lier aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs de l'EPO, de l'IL-3 ou du c-kit.

Les souris motheaten, porteuses d'une mutation aboutissant à une délétion fonctionnelle du gène de l'HCP, meurent en quelques semaines avec de nombreuses anomalies touchant l'hématopoïèse.

Une deuxième voie a été récemment découverte : celle de la famille des **SOCS** (**Suppressor Of Cytokine Signal**). On en compte actuellement 8 (7 SOCS de 1 à 7, plus CIS).

La production de ces protéines régulatrices est induite par les cytokines : certaines (SOCS-1, SOCS-3) se fixent directement avec une forte affinité sur les Jak et inhibent leur activité tyrosine kinase. D'autres, telle que CIS (Cytokine Inducible SH2 containig protein), en réponse à STAT5, entre en compétition avec cette dernière pour les résidus phosphorylés du récepteur. Toutes ces protéines présentent une analogie de séquence avec un domaine carboxyterminal d'environ 40 acides aminés dénommé SOCSbox, dont le rôle n'est pas encore clairement défini, et un domaine SH2 en amont.

Une deuxième possibilité de régulation se situe directement au niveau des STAT. Pour STAT1 et STAT3 on a décrit des protéines inhibitrices PIAS1 et PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT) capables d'inhiber la liaison à l'ADN

III – 3 – Récepteurs solubles et régulation extracellulaire des cytokines

On retrouve des formes solubles pour la plus grande majorité des récepteurs de cytokines. Ils sont produits soit par clivage protéolytique de la forme membranaire, soit par épissage alternatif d'un ARNmessager commun aux deux formes membranaire et secrétée. Le récepteur soluble garde la capacité de se lier à son ligand.

Selon les récepteurs solubles le résultat de la liaison à la cytokine ligand est variable.

Dans certain cas (LIF, TNF, IL-1 et IL-4) un rôle **antagoniste** a été décrit : le récepteur soluble entre en compétition avec la forme membranaire pour la fixation de la cytokine.

Un effet protecteur **(« carrier »)** a aussi été rapporté : la cytokine complexé au récepteur soluble a une demi-vie plus longue que la cytokine libre. La concentration de ligand disponible est ainsi augmentée.

Enfin un deuxième type d'effet facilitant, ou **agoniste**, est observé avec des cytokines comme l'IL-6 ou le CNTF, qui après leur liaison à leur récepteur soluble, sont capables sous cette forme complexée, d'induire un signal à toute cellule qui exprime les molécules de transduction (gp130 et gp130/gp190 respectivement).

*Au cours de l'évolution certains **virus** ont capturé des gènes de récepteurs de cytokines. On retrouve en effet des protéines virales qui présentent de nombreuses analogies avec les récepteurs de cytokines (38% pour la protéine T2 du Shope Fibroma virus et le TNFR[p75], 30% pour la protéine B15 du Pox virus et l'IL-1R [type II], 33% pour la protéinepour la protéine US28 du CMV et les CCR). Ces protéines ont été conservées par les virus car elles leur confèrent probablement un avantage sélectif en modulant en leur faveur la réponse immunitaire de l'hôte.*

D'autres types de ligands naturels sont capables d'inhiber l'action des cytokines, soit après fixation à celles-ci, soit après liaison à leurs récepteurs.

Dans la première catégorie nous citerons, outre les formes solubles de certains récepteurs nous citerons certaines protéines plasmatiques inhibitrices (9**2-macroglobuline**); Pour ce qui est des inhibiteurs du deuxième type, il existe des inhibiteurs naturels, tels que l'**IL-1 RA** (antagoniste du récepteur de l'IL-1), au des auto-anticorps anti-récepteurs.

IV - CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES CYTOKINES

IV – 1 - GÉNÉRALITÉS

Les cytokines ont un rôle fondamental dans tous les mécanismes physiologiques reposant sur la communication intercellulaire. Elles sont donc impliquées dans la régulation des principales fonctions cellulaires.

La liaison d'une cytokine à son récepteur spécifique peut entraîner différents types de réponse selon la cellule, son degré d'activation et son degré de différenciation :

* mouvements cellulaires (cytosquelette)
* activation membranaire (synthèse de médiateurs lipidiques)
* flux calcique
* transcription génique et synthèse protéique
* prolifération (synthèse d'ADN et mitose)
* différenciation
* mort cellulaire

Ceci explique la survenue d'effets **contradictoires** sur un même type cellulaire en réponse à une même cytokine.

*Pour ce qui est de la différenciation cellulaire le problème qui reste en suspens est celui de savoir si la cytokine gouverne réellement cette différenciation (modèle **inducteur**) ou bien si elle se contente d'enclencher la réalisation d'un programme préétabli (modèle **stochastique**).*

Différentes classifications des cytokines existent : nous adopterons une classification basée sur le type de réponse dans laquelle sont impliquées ces médiateurs, en distinguant :

- les cytokines des **réponses immunitaires**, comprenant la quasi-totalité des interleukines, mais aussi l'interféron gamma (IFN1) et les deux formes de facteurs de nécrose des tumeurs (TNF9 et TNF9).

- les cytokines **anti-virales** comprenant les interférons de type 1 (IFN9, 9, 1 et 1), de type 2 (IFN1) et l'interleukine-16 (IL-16).

- les cytokines de **l'inflammation et de la fibrose** dont certaines sont pro-inflammatoires (IL-1, TNF, IL-6), d'autres anti-inflammatoires et/ou fibrosantes (IL-1-RA, IL-10, transforming growth factor béta [TGF9]).

- les cytokines de **l'hématopoïèse** comprenant les différents facteurs de croissance (CSF pour "colony stimulating factors"), le stem cell factor (SCF), mais aussi l'IL-3, l'IL-5 et l'IL-7.

- les **chimiokines** impliquées dans le recrutement des cellules vers le site du conflit.

IV - 2 - Les cytokines des réponses immunitaires

IV – 2 - 1 - Sous-populations de lymphocytes T CD4 Th1 et Th2.

IV – 2 – 1 – 1 - Description

Le lymphocytes T auxiliaire (helper) T CD4 est le pivot, le chef d'orchestre de la réponse immunitaire. Il en existe deux sous-populations selon un profil distinct des cytokines produites qui gouvernent différents types de réponse immunitaire.

Le lymphocyte T CD4 naïf est activé par l'antigène via les liaisons établies au contact de la dendritique au niveau du TCR/CD3 et du CD28. Cette activation requiert la sécrétion par la CPA d'IL-10 et d'IL-12.

Au cours des dernières années on a reconnu, d'abord chez la souris, puis maintenant chez l'homme, deux sous-populations de lymphocytes T helper $CD4^+$, dits TH1 et TH2.

La différence entre les sous-populations de lymphocytes T auxiliaires TH1 et TH2 repose sur la nature des cytokines sécrétées. Certaines sont communes aux deux types de lymphocytes, comme l'IL-3, le TNF9 et le GM-CSF. Les lymphocytes **TH1** sont caractérisés par la sécrétion d'**IL-2**, **IFN**1 et de **TNF**9, alors que les lymphocytes **TH2** le sont par la sécrétion d'**IL-4**, **IL-5**, **IL-6, IL-10** et d'**IL-13**. Les lymphocytes T CD4 qui ont cessé de produire de l'IL-2 utilisent l'IL-4 comme facteur de croissance.

Les **TH1** favorisent donc plutôt la réponse de type i**mmunité cellulaire**, tandis que les **TH2** favorisent plutôt la réponse de type **humorale**, avec synthèse d'anticorps. Ces deux sous-populations dériveraient d'une population primitive dite **TH0**, produisant à la fois de l'**IL-2**, de l'**IFN**1, de l'**IL-4** et de l'**IL-5**.

Cette dichotomie TH1/TH2 est exclusive chez la souris, mais pas aussi formelle chez l'homme. Il n'existe pas de systématisation pour l'IL-10 et l'IL-13.

Il n'existe pas de marqueurs phénotypiques exclusifs des TH1 et des TH2. On note cependant des expressions préférentielles de certains récepteurs de cytokines ou chimiokines qui sont représentées sur le tableau suivant :

Tableau : marqueurs phénotypique des lymphocytes TH1 et TH2

Marqueurs	*espèces*	*TH1*	*TH2*
IFNR chaîne β	homme/souris	-	+
IL-12 chaîne β2	homme/souris	+	-
CCR3	homme	-	+
CXCR3	homme	+	-
CCR5	homme/souris	+	-
CCR4	souris	-	+

Une réponse immunitaire est dite TH1 lorsque ce sont les lymphocytes T CD4 T. H1 qui prédominent sur les lymphocytes T CD4 TH2, et réciproquement.

IV – 2 – 1 – 2 – Différenciation TH1/TH2

Chez la souris on a décrit, à partir de clones TCD4, des cellules **THp** (Thelper precursor) qui ne secrètent que de l'IL-2, et des cellules **TH0** qui produisent de l'IL-2, L'IL-4, l'IL-5 et de l'IFNγ. Ces dernières sont intermédiaires entre les cellules THp et les cellules TH1 et TH2.

Lors d'un premier contact avec un antigène de nombreux paramètres vont orienter la réponse dans un sens ou dans l'autre (réponse cellulaire ou humorale) : nature et dose de l'antigène, site de la stimulation, nature des cellules présentatrices, fond génétique et nature des cytokines produites.

Au sein du microenvironnement l'importance des cytokines est bien illustrée par un modèle animal d'infection par un parasite, Leishmania major. La plupart des lignées de souris guérissent spontanément après avoir monter une réponse de type TH1, caractérisée par une forte production d'IFNγ. Seule la lignée BALB/c succombe à l'infection, après avoir développer une réponse de type TH2, identifiée par une forte production d'IL-4 et d'IL-10. Si on bloque les effets des cytokines par des injections massives d'anticorps (anti-IFNγ ou anti-IL-4) dans les premiers jours, on inverse les résultats : les souris BALB/c deviennent résistantes après injection d'anti-IL-4, alors que les souris naturellement résistantes deviennent sensibles après injection d' anti- IFNγ.

Les facteurs qui gouvernent la programmation des potentialités d'engagement dans la voie TH1 ou TH2 lors de la différenciation des précurseurs T dans le thymus ne sont pas connus. La différenciation dans les tissus du lymphocyte T CD4 TH0 vers l'une ou l'autre voie est conditionnée par son contact précoce avec des cytokines inductrices : **IL-12** pour les **TH1** et **IL-4** pour les **TH2.**

L'**IL-12**, relayée par **STAT4**, est la cytokine de différenciations des lymphocytes **TH1.**

Ceci a été prouvé dans les modèles de souris KO IL-12$^{-/-}$ ou STAT4$^{-/-}$. La source d'IL-12 est principalement constituée par les macrophages et les cellules dendritiques. Une première étape de capacitation est nécessaire pour que la cellule précurseur THp réponde à l'IL-12. A ce stade existe une régulation différentielle de la chaîne β2 de l'IL-12R après stimulation du TCR par l'antigène : l'IL-4 via STAT6 inhibe son expression, alors que l'IFNγ via STAT1 l'augmente. Chez l'homme les interférons de type I (IFNα/β) sont capables d'activer STAT4 de manière indépendante de l'IL-12 et ainsi d'engager vers la voie TH1.

L'IL-4, relayée par **STAT6**, est la cytokine de différenciations des lymphocytes **TH2.**

Ceci a été prouvé dans les modèles de souris KO IL-4$^{-/-}$ ou STAT6$^{-/-}$. La source cellulaire de cette cytokine est plus hypothétique, et vraisemblablement plus diversifiée, que celle de l'IL-12. Y participent : les polynucléaires basophiles, les mastocytes, les lymphocytes T CD4 eux-mêmes et les lymphocytes TNK. Ces derniers sont des lymphocytes qui portent à la fois des marqueurs des lymphocytes T (TCR) et des marqueurs des cellules NK (Natural Killer) (récepteur NK1.1 chez la souris).

Il existe une régulation réciproque négative entre les réponses TH1 et TH2. L'IFNγ inhibe la prolifération des cellules TH2 : ceci s'explique par la persistance de la chaîne β de l'IFNR sur ces dernières, alors qu 'elle est absente de la surface des lymphocytes TH1. A l'inverse l'IL-4 et l'IL-10 produites par les lymphocytes TH2 inhibe la synthèse des cytokines par les cellules TH1, essentiellement par l'intermédiaire de leur action sur les cellules présentatrices d'antigènes.

IV - 2 - 1 - 3 - L'IL-2

Les lymphocytes T matures naïfs sont des cellules quiescentes, dans le stade G0 du cycle cellulaire. L'activation par l'antigène les fait rentrer dans le stade G1 du cycle cellulaire. Elle se traduit par une synthèse d'interleukine-2 (IL-2), cytokine initialement décrite sous le nom de facteur de croissance de lymphocytes T ou TCGF (pour "T cell growth factor"), accompagnée par celle de son récepteur spécifique (IL-2-R). L'IL-2 entraîne une progression des lymphocytes T dans le cycle cellulaire qui se traduit, pendant quelques jours, par la survenue de 2 à 3 mitoses par jour, ce qui permet à une seule cellule de donner naissance à des centaines de descendants qui portent tous le même TCR.

L'IL-2, uniquement produite par les lymphocytes T, est une glycoprotéine de 153 acides aminés et d'environ 15 à 20 kD dont le gène est localisé sur le chromosome 4 q 26-q 27.

L'IL-2 est le **principal facteur de croissance autocrine des lymphocytes T** et indirectement de la sécrétion de l'interféron γ et de la lymphotoxine (LT).

L'IL2 augmente la croissance et l'activité des cellules NK.

C'est également un facteur de croissance pour les lymphocytes B, mais elle ne provoque pas le switch.

Son récepteur est constitué de 3 chaînes polypeptidiques : 9 9 et 1. La chaîne 9 est aussi appelée Tac ou p55 ou **CD 25**, la chaîne 9 p75 ou **CD 122**. La chaîne α (p55, CD25) présente seulement sur les cellules activées s'associe aux chaînes β et γ exprimées sur les lymphocytes T au repos. La chaîne 1 ou sous-unité p64 ne lie pas l'IL-2 et est commune aux récepteurs de l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-15 : elle est appelée chaîne 1 commune.

La chaîne 9 *est associée avec Jak1, la chaîne* 1 *avec Jak3. La voie de signalisation utilise STAT-5. Une mutation de la chaîne* 1*, ou de Jak3, est responsable d'un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (x-scid pour "x-linked cellular immunodeficiency") qui se traduit par l'absence de lymphocytes T et cellules NK.*

L'hétérodimère 9/1 forme un IL-2-R de faible affinité pour l'IL-2 et est retrouvé sur les lymphocytes T quiescents. Les lymphocytes T activés portent un IL-2-R complet, trimère 9/9/1, à forte affinité pour l'IL-2, capable alors de répondre à de plus faibles concentrations d'IL-2. La transduction du signal consécutif à la liaison de l'IL-2 à son récepteur fait intervenir la tyrosine kinase p56 ^{lck}.

La liaison de l'antigène au complexe TCR-CD3 aboutit, en ultime action, à l'apparition de facteurs de transcription. L'un d'entre eux, le NF-AT, ou "nuclear factor of activation of T cells" se lie au

promoteur du gène de l'IL-2, et est donc capable d'induire la transcription du gène de la cytokine. Cette transcription est amplifiée par un facteur de 2 à 3 suite à la liaison de la molécule B7 au récepteur CD28. Le deuxième effet de la liaison B7-CD28 est la stabilisation de l'ARN messager de la cytokine. On voit donc qu'en l'absence de ce 2ème signal il n'y a pas, ou peu, d'IL-2 produite. Ces deux effets conjugués accroissent la production d'IL-2 par un facteur 100.

La régulation de l'expression du récepteur de l'IL-2 est différente de celle de la cytokine ligand. Elle n'est pas aussi dépendante du 2ème signal. La simple liaison du peptide antigénique au complexe TCR-CD3 suffit : un lymphocyte T ainsi activé par une cellule présentant l'antigène sans co-signal (B7) peut donc répondre de manière paracrine à de l'IL-2 exogène.

IV – 2 – 1 – 4 - IL-9 :

*Elle se comporte aussi comme un facteur de croissance des **lymphocytes T**, distinct de l'IL-2 et de l'IL-4. Elle est produite par les lymphocytes T CD4 et agit sur les lymphocytes T CD4 et les mastocytes, mais pas sur les lymphocytes T CD8.*

IV – 2 – 1 – 5 - L'IL-15

Elle a des actions voisines de l'IL-2. Elle utilise en partie le même récepteur, avec une chaîne 9 spécifique, associée aux chaînes IL-2R9 et 1 commune. C'est la cytokine majeure de différenciation des cellules NK.

IV- 2 - 2 - Immunité à médiation cellulaire

Elle se présente sous deux aspects, selon que le lymphocyte T CD4 coopère avec un lymphocyte T cytotoxique CD8 ou un macrophage.

IV - 2 - 2 - 1 - cytotoxicité cellulaire

Elle permet à l'organisme de se débarrasser des cellules infectées par des virus, des cellules allogéniques (rejet de greffes) et des cellules tumorales. L'activation des lymphocytes T CD8 génère des lymphocytes T cytolytiques (CTL).

Les principales cytokines impliquées dans l'induction sont l'IL-2, l'IFN1 produites par le lymphocyte T CD4 T**H1**, l'IL-12 produite par le macrophage et le TNF9 produit par les deux types cellulaires. Les CTL à leur tour produisent des cytokines (IFN9 et 1, TNF9 et 9) qui participent directement ou indirectement aux actions anti-virales ou anti-tumorales.

*IV - 3 - 2 - 1 - 1 - IFN*1

Il provient essentiellement des cellules T **$CD4^+TH1$** et plus accessoirement des $CD8^+$, de quelques cellules NK.

Ses actions sont **anti-virales** et **anti-prolifératives.**

C'est un activateur puissant des monocytes macrophages : on lui a donné également le nom de MAF (Macrophage Arming Factor) surtout pour tuer des germes intracellulaires.

Il augmente l'expression des molécules HLA de classe I et de classe II.

C'est un facteur de différenciation des lymphocytes T et des lymphocytes B (antagoniste de l'IL4 pour l'IgE).

Il active des neutrophiles et des cellules NK.

Il agit sur les endothéliums vasculaires comme le TNF.

IV - 2 - 2 - 1 - 2 - IL-12

L'**IL-12** est un hétérodimère, constitué de deux chaînes, p40 et p35. Elle est essentiellement produite par les monocytes/macrophages en réponse aux bactéries intra-cellulaires (listéria, mycobactéries), à certains produits bactériens (LPS), aux parasites intra-cellulaires (toxoplasme, leishmanie) et aux oeufs de schistosomes;

Sa production est inhibée par l'IL-10.

L'IL-12 est un stimulant global de l'immunité à médiation cellulaire.

Son récepteur est constitué d'une chaîne 9, site de faible affinité pour la sous-unité p40 et voie de transduction du signal, et d'une chaîne 9, site de fixation de la sous-unité p35 qui confère une forte affinité au récepteur.

L'IL-12R utilise les kinases Jak2/Tyr2 et la voie de signalisation STAT-4.

IV - 2 - 2 - 1 - 3 - TNF

C'est le médiateur principal des réponses de l'hôte vis-à-vis des bactéries Gram - dont les composants actifs sont les lipopolysaccharides (endotoxines).

Le **TNF** a en réalité bien d'autres effets que celui décrit en premier sur des tumeurs expérimentales animales.

La source principale est représentée par les macrophages activés par LPS mais aussi d'autres types cellulaires dont les lymphocytes T.

Le TNF fait partie de la même famille que le CD40L (cours sur le *lymphocyte B*) et le FasL (cours sur le *lymphocyte T effecteur*). Il existe sous deux formes : membranaire et soluble (sTNF). Cette dernière est le produit de clivage de la première par une enzyme, la TACE ("TNF9 converting enzyme").

Les récepteurs existent aussi sous forme soluble (sTNF), après clivage ou épissage alternatif : ils ont alors un effet antagoniste de la cytokine à forte dose (compétion) ou agoniste à faible dose (stabilisation des trimères de sTNF).

Il existe trois types de récepteurs : TNFR-I (p55), TNF-RII (p75) et TNF-Rrp (aussi récepteur de la lymphotoxine 9, LT). Le TNF-RI a une forte affinité pour les trimères de sTNF alors que le TNF-RII lie préférentiellement les trimères de TNF membranaires ou de LT.

A faible concentration, le TNF augmente l'adhésion des endothéliums vasculaires aux leucocytes, il active les neutrophiles, il stimule les monocytes/macrophages pour leur faire sécréter d'autres cytokines (IL-1, IL-6, IL-8) et il co-stimule les lymphocytes T et les lymphocytes B.

A plus fortes doses, et après passage dans le sang, il entraîne la fièvre (par les prostaglandines synthétisées par les cellules hypothalamiques), il augmente la sécrétion de l'IL1 et d'IL6 dans la circulation, il induit l'apparition des protéines dites de la phase aiguë dont la CRP, il active le système de la coagulation, il supprime les divisions des cellules souches et il induit la cachexie à long terme.

A très fortes doses ou en cas de grave septicémie à germes Gram -, le TNF est dangereux : c'est lui qui est responsable de la coagulation intra-vasculaire disséminée, de l'hypotension, de l'hypoglycémie...

IV - 2 - 2 - 1 - 4 - La lymphotoxine : LT

Elle a 30 % d'homologie avec le TNF et entre en compétition pour le même récepteur.

Son gène est localisé sur le chromosome 6, près du TNF, dans la région du CMH.

Elle est exclusivement produite par les lymphocytes T activés souvent avec l'interféron γ.

Son action est peu différente de celle du TNF.

Sa quantité sécrétée beaucoup plus faible (non présent dans le sérum).

Elle agit sur les neutrophiles.

IV - 2 - 2 - 1 - 5 - L'IL-18

L'IL-18 est une des dernières des interleukines décrites. Elle est produite par les **hépatocytes**. Elle augmente la cytotoxicité des cellules NK, la production d'interféron 1 par les lymphocytes spléniques. Elle diminue la production d'IL-10.

IV - 2 - 2 - 2 - réponse macrophagique

Le macrophage a pour cible des pathogènes intra-cellulaires et nécessite l'aide du lymphocyte T CD4 Th1. Il est attiré au site du conflit par des chimiokines (RANTES) et activé par différentes cytokines (IFN1, GM-CSF, TNF). Les principaux facteurs de régulation négative du macrophage sont les IL-4 et IL-10, produites par les lymphocytes T CD4Th2.

Le macrophage produit des cytokines aux activités pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF) capables de rétrocontrôle positif sur le lymphocytes TCD4Th1 (IL-1, IL-12, TNF), sur le macrophage lui-même (GM-CSF, TNF) ou sur l'hématopoïèse.

IV - 2 - 2 - 2 – 1 - IL-1

Anciennement appelée **LAF** (**Lymphocyte Activating Factor**) l'IL-1 est issue du macrophage activé par le LPS. On distingue une IL19 et une IL19 assez différentes dans leur structure (que 28 % d'homologie), pourtant partageant le même récepteur et ayant les mêmes effets.

Avec les activateurs polyclonaux du type PMA, ils facilitent la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ et même des lymphocytes B. Ils stimulent une variété de cellules qui fonctionnent dans leur réponses immunitaires et inflammatoires. Ils partagent beaucoup des propriétés phlogogènes du TNF. C'est un puissant **inducteur** de la sécrétion d'**IL-6.**

A fortes doses : ils sont responsables de la fièvre, l'augmentation des protéines de la phase aiguë (CRP) et de la cachexie. A la différence du TNF9 il n'est pas létal à fortes doses, il ne cause pas la nécrose hémorragique des tumeurs.

C'est un co-stimulateur puissant des phases précoces d'activation des cellules T.

C'est la seule cytokine connue ayant des **inhibiteurs** naturels de formule voisine de la cytokine elle-même : il s'agit du **IL-1RA** (pour Antagoniste du Récepteur). Il se produit un phénomène d'inhibition compétitive. L'IL-1RA se fixe au récepteur, mais, contrairement à la cytokine, n'entraîne pas le déclenchement de la voie de signalisation. Il est produit par les macrophages activés par les complexes Ag-Ac. On imagine évidemment des applications thérapeutiques intéressantes à venir.

IV - 2 - 2 - 2 – 2 - IL-6 :

L'IL-6 est le prototype des cytokines **multifonctionnelles.** Elle est principalement produite par les **monocytes**, mais aussi par les cellules T et B, endétholiums vasculaires, fibroblastes.

L'IL-1 et le TNF sont de puissants inducteurs de la sécrétion d'IL-6.

Initialement décrit sous le nom de **BCDF** (**B C**ell **D**ifferentiation **Fa**ctor), c'est un facteur de différenciation terminale et de maturation des lymphocytes B. En pathologie c'est un facteur de croissance des plasmocytes malins du myélome.

Elle active aussi les lymphocytes T, et participe à l'hématopoïèse précoce, ce qui explique la thrombocytose de l'inflammation.

L'IL-6 fait synthétiser par les hépatocytes plusieurs protéines plasmatiques de la phase aiguë : CRP, haptoglobine, fibrinogène.

Son récepteur appartient à la nouvelle famille des récepteurs de cytokines (récepteur à gp130). Il utilise les kinases Jak1/Jak2 et la voie de signalisation STAT-3.

IV - 2 - 2 – 2 - 3 - IL-11 :

Elle a des propriétés proches de l'IL-6. C'est un facteur de croissance des plasmocytes. Son récepteur partage la même chaîne gp130 commune avec celui de l'IL-6.

IV - 2 - 2 - 2 – 4 - IL-17 :

L'IL-17 est une glycoprotéine de 155 acides aminés sécrétée à l'état de dimère par les lymphocytes T CD4 mémoire. Elle présente une homologie avec le produit d'un gène viral (Herpes virus Saimiri).

L'IL-17 stimule la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de GM-CSF par les cellules épithéliales, endothéliales et par les fibroblastes. Elle permet également aux fibroblastes de supporter la différenciation des précurseurs CD34$^+$ en polynucléaires neutrophiles.

IV - 2 - 3 - Immunité à médiation humorale

Elle est supportée par les cytokines de type **Th2**. L'IL-4 et l'IL-10 sont suffisantes pour obtenir l'activation du lymphocyte B mature naïf. L'IL-6, surtout produite par les macrophage est essentiellement un facteur de prolifération plasmocytaire. Dans les centres clairs germinatifs c'est le type de cytokines produite qui oriente la commutation : IL-4 et IL-13 vers les IgE et les IgG4 ; TGF9 et IL-10 vers les IgA ; IL-10 vers les IgG1 et IgG3.

IV - 2 - 3 - 1 - IL-4 :

C'est l'interleukine de l'**hypersensibilité immédiate de type I.**

Anciennement dénommé **BCSF1** (**B C**ell **S**timulating **F**actor **1**) l'IL-4 est produite par les lymphocytes T CD4$^+$ et les mastocytes activés.

Comme facteur de croissance et de différenciation sur les lymphocytes B, son rôle majeur est de provoquer le **switch** vers la classe **IgE**. Elle augmente l'expression du CD23.

C'est un facteur de croissance autocrine pour la sous-population des lymphocytes T-helper (Th2).

C'est un facteur de croissance pour les mastocytes et pour leur activation en synergie avec l'IL3.

Elle active les macrophages mais moins efficacement que l'interféron 1.

Son récepteur est associé avec les kinases Jak1 pour sa chaîne 9, Jak 3 pour la chaîne 1 commune, et utilise STAT-6 pour la signalisation.

IV - 2 - 3 - 2 - IL-13 :

Elle stimule aussi la synthèse de l'**IgE**.

Son récepteur partage la chaîne 9 de l'IL-4R, associée à une chaîne de liaison spécifique. Il utilise les kinases Jak1/Jak2 et la voie STAT-6.

IV - 2 - 3 - 3 - IL-14 :

*C'est un facteur de croissance des **lymphocytes B**, de haut poids moléculaire, encore peu étudié.*

IV - 2 - 3 - 4 - IL-5

Elle agit en synergie avec d'autres cytokines pour la différenciation des lymphocytes B. C'est en outre le facteur de croissance des **éosinophiles.**

L'IL-5 est également un facteur de croissance et de différenciation sur la lignée B, favorisant plutôt la synthèse de l'**IgA**.

IV - 2 - 3 - 5 - IL-10

C'est une cytokine pléiotropique produite par les lymphocytes Th2, mais aussi par les monocytes et les lymphocytes B, capables d'**inhiber** spécifiquement la synthèse d'interféron γ, des cytokines pro-inflammatoires et la fonction des cellules présentatrices d'antigène. Elle a été initialement décrite sous le nom de **CSIF** ("cytokine synthesis inhibitory factor"). Sur la lignée B, cette cytokine induit la différenciation terminale en plasmocytes et un taux de synthèse d'immunoglobulines élevé.

Le gène de l'IL-10 présente une forte homologie avec un gène du virus d'Epstein-Barr, conférant à ce dernier le pouvoir d'inhiber les CTL spécifiques dirigés contre lui.
L'IL-10R utilise les kinases Jak1/Tyr2 et la voie de signalisation STAT-3.

IV - 2 - 3 - 6 - Le TGF β

Le Transforming Growth factor 9 (TGF9) est constitué de deux polypeptides de 14 kD. En culture, presque toutes les cellules le sécrètent. In vivo les sources sont les lymphocytes T activés par l'antigène et les macrophages activés par LPS. Il est très pléiotropique.

Il entraîne une forte croissance de nombreuses cellules et tissus, dont l'angiogénèse.

C'est une sorte d'**anti-cytokine** car il inhibe l'activation des lymphocytes T, l'activation des macrophages.

Chez la souris, il provoque le switch vers l'**IgA**.

Avec l'IL-10, c'est l'une des cytokines produites par les sous-populations de lymphocytes T régulateurs.

IV - 2 - 4 - Cytokines anti-virales

Elles comprennent les interférons de type 1, l'IFN1 et l'IL-16

IV - 2 - 4 - 1 - Interférons type 1 : IFNα et IFNβ :

Les **interférons** (**IFN**) sont des glycoprotéines synthétisées par la plupart des cellules en réponse à différents stimuli, au premier rang desquels on trouve les infections virales. Leur principale fonction est d'induire un état de résistance à la multiplication virale. D'autres agents infectieux sont capables d'induire la synthèse des interférons (*Listeria monocytogenes, Haemophilus influenzae, Brucella,* etc...).

Les interférons sont regroupés en trois familles :

- les interférons alpha (**IFN**9) sont produits par les leucocytes, les monocytes et les cellules Natural Killer (NK). Ils sont peu glycosylés et on en décrit de nombreux variants (au moins 14).

- les interférons bêta (**IFN**9) sont produits par les fibroblastes.

- les interférons gamma (**IFN**1) sont produits par les lymphocytes T activés après contact avec leur antigène spécifique et par les cellules NK.

Les interférons α sont au nombre de 20 environ, ils proviennent surtout des monocytes/macrophages. L'interférons β, unique, provient des fibroblastes. Les deux types sont produits à la suite généralement d'infection virale.

Ces médiateurs inhibent la réplication virale ainsi que la prolifération cellulaire. Ils augmentent le potentiel lytique des cellules NK ainsi que l'expression des molécules HLA de classe I, préparant les cellules à l'action des lymphocytes T8 cytotoxiques. Ils inhibent également la prolifération cellulaire.

L'IFN est sous sa forme recombinante, est commercialisé et a donné lieu déjà à d'assez nombreux essais thérapeutiques en matière de cancers évolués et de la leucémie à tricholeucotytes.

L'INF9 recombinant est actuellement à l'essai dans la sclérose en plaques.

Apparaissant quelques heures après une infection, les interférons relargués dans le milieu extra-cellulaire par les cellules infectées, se fixent sur des récepteurs spécifiques des cellules avoisinantes. Ils y induisent la synthèse de protéines (2-5-polyA-synthétase, protéine kinase) qui rendent la cellule cible réfractaire à l'infection.

En dehors de cette action anti-virale, les interférons modulent de différentes manière la réponse anti-infectieuse. Ils ont une activité inhibitrice de la croissance cellulaire. Ils augmentent l'expression des molécules HLA de classe I pour les IFN9.

IV - 2 - 4 - 2 - IL-16.

Produite par les épithéliums, les mastocytes, les lymphocytes T CD8, elle possède une action anti-virale par son pouvoir chemoattractif et son activation des lymphocytes T CD4. Cette dernière molécule (CD4) est son récepteur.

IV - 3 - 8 - Chimiokines

Les chimiokines sont des médiateurs de l'inflammation de faible poids moléculaire définis par leur capacité à recruter des cellules immunocompétentes selon un gradient chimiotactique. Elles exercent cette fonction par liaison à des récepteurs spécifiques. Le site de liaison au récepteur est dans leur région N-terminale : en fonction du nombre d'acides aminés présents entre deux résidus cystéine conservés dans cette région, on distingue quatre familles de chimiokines, dont deux principales :

- la famille des **CXC-chimiokines** (ou 9-chimiokines), dont le chef de file est l'**IL-8**, produite principalement par les monocytes/macrophages; En sont membres : la platelet

basic protein (PBP), le facteur 4 plaquettaire (F4P), la 9-thromboglobuline (9-TG), les molécules NAP("Neutrophil activator proteins"), le gamma interferon inducing protein (IP10) et le SDF1 ("stroma-derived factor 1), qui est un facteur de croissance indispensable à l'ontogénèse B (cf cours sur le *Lymphocyte B, III-1*).

- la famille des **CC-chimiokines** (ou 9-chimiokines) qui exercent leur pouvoir attractif sur de nombreuses cellules, à l'exclusion des polynucléaires. Font partie de cette famille : les MIP19 et 9 ("Macrophage inflammatory peptide 1α et β), les MCP 1, 2, 3, 4 et 5 ("Monocyte chemoattractant protein"), la molécule RANTES ("Regulated upon Activation Normal T Expressed and Secreted") et l'éotaxine.

Chacune de ces chimiokines se lient à des récepteurs spécifiques (10 CCR et 4 CXCR).

Deux des récepteurs (CCR5 et CXCR3, dont les ligands sont respectivement MIP19 et 9 et SDF1) viennent d'être identifiés comme corécepteur du virus VIH, des monocytes (CC-R5) et des lymphocytes (CXC-R3).

IV - 2 - 6 - Cytokines stimulant l'hématopoïèse

Il s'agit des **CSF**, c'est-à-dire des **Colony Stimulating Factors**, médiateurs contrôlant la différenciation et la maturation des cellules souches hématopoiétiques aussi bien dans la moelle qu'en périphérie.

IV - 2 - 6 -1 L'érythropoiétine

Issue des cellules péritubulaires rénales elle est connue depuis fort longtemps, est même utilisée en thérapeutique dans certaines formes d'anémie d'origine centrale (dialysés), voire par certains sportifs !!!

IV - 2 - 6 - 2 - IL-3 ou multi CSF

L'IL-3 provient essentiellement des lymphocytes T CD4 activés, agit, en synergie avec l'IL-6, sur les cellules souches toutes initiales et également sur les lignées qui en découlent. Elle est spécialement active pour la prolifération, la différenciation des basophiles et des mastocytes.

IV - 2 - 6 - 3 - Le GM-CSF

C'est le facteur de stimulation de la lignée granulocytaire et monocytaire qui provient des lymphocytes T activés, des macrophages activés, des cellules endothéliales, des fibroblastes, du stroma de la moelle. Il n'est pas détecté dans la circulation.

IV - 2 - 6 - 4 - M-CSF

Le facteur de croissance des monocytes macrophages ne circule pas non plus. C'est une tyrosine kinase.

IV – 2 – 6 – 5 - G-CSF

Le facteur de croissance de la lignée granulocytaire est au contraire présent sous forme circulante dans le plasma.

IV – 2 – 6 – 6 - L'IL-7

Elle agit sur les progéniteurs B. C'est également un facteur de croissance des thymocytes et des lymphocytes T matures CD4 et CD8.

Résumé

Les cytokines sont des médiateurs solubles néoformés principalement produits par les cellules immunocompétentes qui facilitent le transfert d'information entre elles sur des modes autocrine, paracrine, voire endocrine. Elles sont caractérisées par deux propriétés : le pléïomorphisme des sources cellulaires et des cibles, expliquant la redondance de leur activité, qui se fait le plus souvent en cascade. Elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques bâtis sur le modèle des immunorécepteurs, avec une chaîne de reconnaissance associée à une chaîne de signalisation, parfois commune à plusieurs récepteurs. On distingue six familles de récepteurs selon les homologies structurales. La signalisation intra-cytoplasmique fait intervenir des kinases de la famille Jak asssociées aux molécules STAT. Selon le type de cytokines produites on différencie deux sous-populations de lymphocytes T CD4, Th1 et Th2 : les premiers secrètent de l'IL-2 et de l'IFNγ et sont impliqués dans le versant cellulaire de la réponse immunitaire, alors que les seconds par les IL-4, -5, -6, -10 et -13 qu'ils produisent interviennent dans la part humorale. Sur le plan fonctionnel on distingue des cytokines qui interviennent dans la régulation de la réponse immunitaire, dans celle de l'inflammation, dans la réponse aux virus, dans l'hématopoïèse et la famille particulière des chimiokines qui gouvernent la migration cellulaire.

POUR EN SAVOIR PLUS

Taczuck J. Cytokines : physiologie et implications diagnostiques et thérapeutiques. *Revue Française des Laboratoires* 2000, 327 : 39

Revue Française des Laboratoires 2000, 328 : numéro spécial

Dy M. Cytokines in *12ème cours annuel de la SFI*

Emilie D, Galanaud P. Chimiokines et leurs récepteurs : leur rôle dans l'infection par le VIH. *Médecine/thérapeutique* 1998, 4 : 663-6

Mégarbane B, Galanaud P, Emillie D. Cytokines du système de défense : interleukines et chimiokines. *Médecine/thérapeutique* 1998, 4 : 641-53

Pol S, Zylberberg H Interférons : des mécanismes d'action aux applications cliniques en hépatologie. *Médecine/thérapeutique* 1998, 4 : 323-31

Cavaillon JM. Les cytokines Paris, Masson 1993

TESTEZ-VOUS

1 - Les cytokines :

A - sont des médiateurs solubles préformés
B - ont un poids moléculaire compris entre 100 et 150 kD
C - sous leur forme recombinante, pour certaines, sont déjà utilisées en thérapeutique
D - se fixent à un récepteur spécifique sur leur(s) cellule(s) cible
E - ont le plus souvent un pléïmorphisme d'activité

2 - Parmi les cytokines énumérées ci-dessous, quelle(s) est (sont) celle(s) qui n'est (ne sont) pas synthétisée(s) par le lymphocyte T $CD4^+$Th2:

A - interleukine-4 (IL-4)
B - interleukine-2 (IL-2)
C - interleukine-10 (IL-10)
D - interféron-1 (IFN1)
E - interleukine-6 (IL-6)

3 - Parmi les cytokines énumérées ci-dessous quelles sont celles qui sont produites par des lymphocytes T $CD4^+$ Th2

A - IL-2
B - IL-4
C - IL-10
D - TFN-α
E - IL-5

4 - Parmi les cytokines énumérées ci-dessous, quelle(s) est (sont) celle(s) qui n'est (ne sont) pas synthétisée(s) par le lymphocyte T $CD4^+$Th1 :

A - interleukine-4 (IL-4)
B - interleukine-2 (IL-2)
C - interleukine-10 (IL-10)
D - interféron-1 (IFN1)
E - interleukine-6 (IL-6)

5 - Parmi les cytokines énumérées ci-dessous, quelle(s) est (sont) celle(s) qui a (ont) une activité anti-inflammatoire:

A - TNF ("Tumor Nécrosis Factor")
B - IL-10 (interleukine-10)
C - IL-1 (interleukine-1)
D - IL-6 (interleukine-6)
E - IL-1RA (antagoniste du récepteur de interleukine-1)

6 - L'interleukine 2 :

A - est le principal facteur de croissance des éosinophiles
B - est le principal facteur de croissance des lymphocytes T
C - accroît l'activité des cellules NK
D - utilise un récepteur de haute affinité formé de trois chaînes
E - commence à être utilisée en thérapeutique anticancéreuse

7 - Quelle(s) est (sont) la (les) cytokine(s) qui n'intervient(nent) pas dans la maturation et la différenciation des lymphocytes B :

A - IL-2
B - IL-3
C - IL-4
D - IL-5
E - IL-6

IMMUNITÉ NATURELLE

I - INTRODUCTION

II - PROTECTION PHYSIQUE, CHIMIQUE ET ÉCOLOGIQUE

II -1 Protection mécanique

II-1-1 La peau
II-1-2 Les voies aériennes
II-1-3 L'oeil
II-1-4 Le tube digestif
II-1-5 L'appareil génito-urinaire

II-2 Protection chimique

II-3 Protection ecologique

III FACTEURS CELLULAIRES

IV- FACTEURS PLASMATIQUES

IV-1- Protéines de la phase aiguë de l'inflammation

IV - 1 - 1 - La protéine C réactive
IV - 1 - 2 - L'haptoglobine
IV - 1 - 3 - Les autres protéines de phase aiguë

IV- 2. Le complément

IV-3. Les cytokines

IV-4. Autres facteurs plasmatiques

V - MISE EN JEU DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE

V - 1 - Les PAMPs ou MMAP

V - 2 - Les PRRs
V - 2 - 1 - molécules sécrétées
V - 2 - 2 - les récepteurs de phagocytose
V - 2 - 3 - Toll-like receptors (TLRs)

V - 3 - lien réponse innée/réponse adaptative.

VI- LA RÉACTION INFLAMMATOIRE

VI-1. La diapédèse

VI-2. La phagocytose

VI-3. Cytokines et inflammation

VI-4. La présentation de l'antigène

IMMUNITÉ NATURELLE : OBJECTIFS

Niveau A :

- **Définition de l'immunité naturelle**
- **Distinction immunité naturelle/immunité spécifique (tableau)**
- **Enumérer les différents mécanismes de protection physique, chimique, écologique**
- **CRP : fonction, cinétique de variation**
- **Définition des PAMPs, des PRR**
- **TLR : fonctions**
- **Définitions de : inflammation, diapédèse, chimiotaxie, phagocytose, opsonisation**
- **Rôle des cytokines dans l'inflammation**

Niveau B :

- **Principes des différents mécanismes de protection physique, chimique, écologique**
- **haptoglobine**
- **TLR : principaux ligands, domaine TIR**

IMMUNITÉ NATURELLE

I - INTRODUCTION

La réponse immunitaire fait intervenir deux types de mécanismes qui sont d'apparitions successives au cours de l'évolution des espèces et sont intimement connectés chez les organimes supérieurs : **l'immunité naturelle non spécifique** et **l'immunité acquise spécifique adaptative.**

La mention initiale de la première remonte à l'antiquité quand Celsus décrivit l'inflammation. Les fondements scientifiques en furent posés au début du XX^{ème} siècle par Metchnikoff, qui découvrit la phagocytose, et Bordet le complément. Son étude est longtemps restée le parent pauvre de l'immunologie. Ce n'est que dans les dix dernières années que sa connaissance a réellment progressée.

L'immunité **naturelle**, encore appelée **innée** ou **naïve**, repose sur une distinction globale du soi et du non-soi, et fait intervenir des mécanismes de protection physique (barrière du revêtement cutané, ciliature bronchique, péristaltisme intestinal), des mécanismes cellulaires (cellules phagocytaires, cytotoxiques) et humoraux (lysozyme, complément, interféron, etc...). C'est une réponse **immédiate**, **non spécifique** de l'agresseur et **non adaptative**. L'immunité naturelle fournit une réponse immédiatement recrutable en attendant que l'immunité acquise devienne opérationnelle.

Elle repose sur la réponse au stress à l'échelle cellulaire :

- *stress métaboliques (déficits en nutriments)*
- *stress physiques (hyperthermie, radiations X, UV ou γ)*
- *stress toxiques*
- *infections virales*

La réponse immunitaire innée existe chez tous les organismes multicellulaires au contraire de la réponse immunitaire adaptative qui n'est retrouvée que chez les vertébrés.

La réponse immunitaire innée, première en terme de phylogénie, s'apparente à **une première ligne de défense** contre les pathogènes. Elle repose sur des mécanismes qui sont mobilisables en quelques secondes ou minutes, mais qui ne sont pas spécifiques du pathogène agresseur : ce sont principalement la **phagocytose** par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, la **cytotoxicité** par les cellules NK, la libération d'enzymes hydrolytiques, de peptides anti-microbiens et d'intermédiaires oxydatifs par les phagocytes, l'activation du complément par la voie alterne ou par celle des lectines. D'autres mécanismes rapidement inductibles, comme la génération de monoxyde d'azote (NO) ou de protéines de la phase aiguë de l'inflammation, relèvent aussi de la réponse immunitaire innée.

Les mécanismes effecteurs de l'immunité innée sont essentiellement les mêmes que ceux recrutés lors de sa phase effectrice tardive par l'immunité acquise: au cours de l'évolution l'immunité naturelle est apparue la première, s'attachant à reconnaître les structures conservées des microorganismes pathogènes pour effectuer une distinction globale du soi et du non-soi. L'immunité acquise, apparue secondairement s'est appropriée tout ou partie de ces mécanismes pour amplifier sa réponse.

L'immunité naturelle repose sur des mécanismes **humoraux** et **cellulaires**.

Les facteurs non spécifiques s'opposent à la pénétration, à la persistance et à la multiplication des agents infectieux.

On doit distinguer les facteurs de défense non spécifiques, constitutifs, des barrières anatomiques, qui constituent une première ligne de défense (de surface), de ceux, inductibles, des tissus, principalement représentés par la réaction inflammatoire, constituant une deuxième ligne.

L'immunité naturelle vise à combattre les agressions de nature traumatique ou infectieuse. Elle fait appel, sur le plan humoral, à des systèmes d'activation en cascade, caractérisés par la formation d'agrégats moléculaires doués pour certains de leurs composants d'activité protéolytique. Citons la coagulation, la fibrinolyse, le système contact, celui des kinines et celui du complément. Certains des produits de clivage ainsi générés sont doués de propriétés chimiotactiques capables d'attirer les cellules phagocytaires (polynucléaires, monocytes/macrophages dans le site du conflit) ou de permettre, par leur action sur les cellules endothéliales de favoriser le passage dans les tissus (vasodilatation, diapédèse).

Cette réponse immédiate est localisée et limitée dans le temps, grâce à des mécanismes de régulation humoraux et cellulaires. Pour beaucoup elle fait intervenir des interactions entre la cellule endothéliale et les cellules immunocompétentes. Elle prend place pendant le délai (une semaine) nécessaire à l'induction de la réponse immunitaire spécifique, qui parachève son action en cas de besoin.

Elle est suivie par une phase de réparation qui commence par l'élimination des cellules lésées (phagocytose), se poursuit par une restitution ad intégrum du tissu lésé qui peut nécessiter l'apparition d'une fibrose, d'une angiogénèse et d'un remodelage tissulaire à des degrés divers, sous le contrôle des cytokines.

II-PROTECTION PHYSIQUE, CHIMIQUE ET ÉCOLOGIQUE

En dehors de l'introduction par des insectes piqueurs, par des piqûres accidentelles ou par l'intermédiaire de plaie cutanée, la barrière cutanéo-muqueuse représente un obstacle en principe infranchissable aux micro-organismes.

Il n'en va pas de même au niveau des muqueuses qui représentent une beaucoup plus vaste surface de contact avec l'extérieur (**5-600 m^2** contre 1,73 m^2 pour la peau), et où la monocouche cellulaire épithéliale est beaucoup plus fragile.

Les barrières anatomiques (peau, muqueuses) assurent une triple protection : **mécanique, chimique et biologique.**

II-1 PROTECTION MÉCANIQUE

La protection mécanique peut être :

- soit **statique**
  - * solidité des couches cellulaires kératinisées de la peau.
  - * fragilité de la couche monocellulaire des muqueuses.
- soit **dynamique** :
  - * péristaltisme du tube digestif
  - * écoulement de fluides (urine, larme)
  - * cellules ciliées (bordures en brosse, bronchiques par exemple) associées au mucus, s'opposant à l'adhérence des bactéries.

II-1-1 La peau

La peau est une barrière très efficace puisqu'un nombre très restreint de micro-organismes est capable de franchir un revêtement cutané intact (*Franscicella tularensis, Brucella* sp). Cette barrière est constituée par un **épithélium kératinisé** de plusieurs couches dont les couches les plus superficielles de cellules déshydratées sont régulièrement éliminées par desquamation.

La **sécheresse** de la peau et son **renouvellement** permanent sont deux facteurs importants de défense.

Sur une peau saine on ne dénombre que 100 à 1000 bactéries par cm^2. Sur une peau abrasée (par brûlure par exemple) on peut en compter jusqu'à 1 à 10 millions par cm^2, principalement dominées par Staphylococcus aureus et par des bactéries Gram négatives.

Les bactéries ont en effet besoin d'un degré minimum d'hygrométrie pour se développer. Les points de rupture des conditions locales de sécheresse, mais aussi de pH acide, tels les pores, les follicules

pileux et les glandes sébacées présentent des conditions propices au développement bactérien (folliculite). A leur niveau interviennent les mécanismes de protection chimique.

II-1-2 Les voies aériennes

Au niveau de la bouche et de la gorge le flot de la **salive** limite l'accumulation bactérienne par un phénomène d'élimination physique. Le nez est protégé par le filtre que représentent les poils, les cornets qui modifient le flux aérien, le mucus nasal et la réponse d'éternuement. Les voies aériennes inférieures sont normalement stériles. Les courbures de l'arbre bronchique créent des turbulences qui propulsent les particules inhalées de la taille des bactéries (entre 5 et 10 µm) vers les parois de l'arbre bronchiques où elles sont piégées par le mucus et véhiculées du bas vers le haut par le système **ciliaire**.

II-1-3 L'oeil

La défense anti-infectieuse majeure à ce niveau est représenté par la présence continuelle de **larmes** qui contiennent les mêmes substances chimiques que la salive. Cet écoulement régulier fonctionne aussi comme un lavage protecteur auquel s'associe le battement des paupières. Toute sécheresse oculaire s'accompagne d'une susceptibilité aux infections.

II-1-4 Le tube digestif

Le principal mécanisme de défense anatomique à ce niveau est représenté par le **péristaltisme intestinal** qui agit en association avec les mécanismes chimiques et qui favorise les mécanismes biologiques.

Le péristaltisme permanent de l'intestin grêle entraîne un lavage constant expliquant que le nombre de bactéries présentes dans l'intestin grêle soit faible, au contraire du colon, où les mouvements du bol alimentaire sont très réduit, et où la densité bactérienne est élevée. Près de la moitié du volume du colon est occupé par les bactéries. Cette colonisation par une flore commensale est bénéfique puisqu'elle constitue, comme nous allons le voir, une barrière écologique.

De plus le **renouvellement** rapide des cellules épithéliales permet une élimination des bactéries qui y aurait adhéré.

L'intégrité des tissus sous-épithéliaux est maintenu grâce à la présence de structures spéciales entre les cellules épithéliales qui assurent une cohésion ferme entre les cellules.

*Ces **jonctions serrées** ("tight junction") empêchent le passage des bactéries, mais aussi des fluides et des électrolytes. La seule voie de pénétration des bactéries reste l'invasion de cellules particulières de l'épithélium muqueux. Ces **cellules, dites M**, sont dépourvues de villosités, de cils et de la capacité de produire du mucus. Leur fonction est d'ingérer les bactéries et autres particules du bol alimentaire et de les transmettre aux macrophages sous-jacents. En cas de non contrôle de l'invasion infectieuse par ces derniers, la réaction inflammatoire qui s'en suit entraîne une ouverture de ces jonctions serrées.*

II-1-5 L'appareil génito-urinaire

Des mécanismes de protection physique expliquent en partie la stérilité normale de ces organes creux. Ainsi l'utérus et les trompes de Fallope sont protégés par le bouchon de mucus qui obstrue le col utérin alors que le rein et la vessie sont en permanence lavés par l'urine et protégés par la fermeture des sphincters urétraux.

II-2 PROTECTION CHIMIQUE

Différents mécanismes chimiques viennent compléter localement les barrières anatomiques de protection

Au niveau de la peau on peut citer le rôle de la **sueur** qui a une activité bactéricide grâce aux acides gras, à l'acide lactique et au lysozyme.

Au niveau des muqueuses un mince film de **mucus** recouvre les cellules épithéliales. Produit des cellules à mucus il remplit de multiples fonctions protectrices (lubrifiant, piège à bactéries).

Le **lysozyme** dégrade le peptidoglycan bactérien, et est surtout efficace vis-à-vis des bactéries Gram positif (celui des bactéries Gram négatif est protégé par la membrane externe).

La **lactoferrine** est une protéine chélatrice du fer qui est un élément indispensable pour la croissance et la multiplication de nombreuses bactéries.

Enfin la **lactoperoxydase** est une enzyme intervenant dans la production des radicaux libres d'oxygène qui sont bactéricides.

L'intestin grêle et le colon contiennent de grande quantité de **sels biliaires** et d'**enzymes protéolytiques pancréatiques**. Les sels biliaires agissent comme détergents, détruisant la membrane bactérienne.

Certains mécanismes chimiques de défense non spécifique reposent sur le rôle de l'**acidité** des différents milieux. L'environnement acide du suc gastrique est capable d'inhiber la croissance de nombreuses bactéries.

La plus grande fréquence d'infections intestinales chez les sujets achlorhydriques en est la preuve. Quelques bactéries (Hélicobacter pylori) ont développé des systèmes tampons qui leur permettent de survivre dans cet environnement hostile. Les muqueuses vaginales et cervicales sont colonisées par une flore commensale dont la composition complexe est sous influence hormonale. Néanmoins on y retrouve principalement des espèces de type Lactobacillus, produisant un pH bas lié à l'acide lactique.

II-3 PROTECTION ECOLOGIQUE

Au niveau muqueux, mais aussi cutané, l'existence d'une flore bactérienne commensale constitue une protection biologique contre la colonisation par des souches pathogènes. Cette flore commensale est responsable d'une **barrière écologique** par compétition pour les nutriments et les sites à coloniser.

Au niveau de la peau elle est principalement représentée par des bactéries Gram positif (St. aureus, St. epidermidis) particulièrement adaptées au conditions de sécheresse et de pH acide du revêtement cutané. Au niveau du colon l'importante flore commensale est principalement constituée de germes anaérobies qui, par compétition, empêchent toute tentative d'implantation et de colonisation par d'autres bactéries. Cette compétition intéresse les nutriments, les sites à coloniser et la production d'anti-métabolites toxiques.

III FACTEURS CELLULAIRES

Les cellules impliquées dans l'immunité naturelle ont aussi un rôle crucial dans l'initiation et l'amplification ultérieure de la réponse immunitaire adaptative. Ce sont les **polynuléaires**, les **macrophages** et les **cellules NK**("natural killer"). De plus, eu égard au délai de quatre à cinq jours pour la mise en action de cette dernière, l'immunité naturelle est essentielle pour circonscrire les infections durant cette période. Ces cellules ont été étudiées dans le cours spécifique "cellules de l'immunité".

Nous renvoyons au cours sur les *cellules de l'immunité* pour la description de ces trois types cellulaires.

IV- FACTEURS PLASMATIQUES

Les facteurs humoraux sont non spécifiques de l'antigène, capables de reconnaître des **motifs invariants** exprimés à la surface de nombreux agents et permettant ainsi une distinction global du non-soi. Parmi eux on retrouve un ensemble de protéines plasmatiques qui forment le système du **complément**, certains médiateurs solubles regroupés sous le nom de **cytokines**, et plus particulièrement les interférons, et diverses protéines dont la synthèse est accrue à la **phase aiguë de l'inflammation**.

IV-1- Protéines de la phase aiguë de l'inflammation

Elles sont présentes dans le sérum en petite quantité. Elles fonctionnent pour certaines comme des opsonines vis-à-vis des pathogènes, pour d'autres comme des régulateurs des systèmes protéolytiques activés. Elles sont pour la plupart synthétisées par l'**hépatocyte**, fortement inductibles par l'interleukine-6 (**IL-6**) libérée par les macrophages activés. Elles sont dosables par néphélémétrie, et pour les plus couramment explorées sont :

- la **protéine-C-réactive ou CRP**
- l'**haptoglobine**
- l'**orosomucoïde**
- le **fibrinogène**
- les **composants C3 et C4** du complément
- mais aussi les **protéines A et P amyloïdes** (SAA et SAP), la **Mannose Binding Protein** (MBP, cf cours du *Complément*)

La réponse de phase aiguë déclenchée par les cytokines pro-inflammatoires, avec au premier rang l'IL-6, se rencontre dans :

- *les maladies inflammatoires*
- *les infections*
- *les proliférations malignes*
- *les nécroses tissulaires*
- *les pancréatites, les cholécystites*
- *les traumatismes (fractures, brûlures)*

IV - 1 - 1 - La protéine C réactive

*La CRP fait partie avec la SAP de la famille des **pentraxines**, constituées de séquences répétitives de cinq régions constituants un disque formant un anneau, simple pour la CRP, double pour la SAP;*

Le taux physiologique de CRP est **inférieur à 5 mg/L**, sans variation nycthémérale, et faiblement augmenté par les oestrogènes et la grossesse.

Son élévation est très forte, jusqu'à 1000 fois la normale, et très précoce (moins de 24 heures) au cours des lésions tissulaires, qu'elles soient de nature inflammatoire, infectieuse ou traumatique.

La CRP doit son nom à sa capacité de fixation au polysaccharide C du pneumocoque. Elle fonctionne en effet comme une **opsonine calcium-dépendante** vis-à-vis des parois bactériennes, entraînant l'activation de la voie classique du complément après **fixation au C1q**. Elle peut aussi reconnaître des substrats endogènes, telles que les histones, les petites ribonucléoprotéines (snRNP) et la chromatine, participant ainsi à l'épuration des produits du catabolisme cellulaire.

*Son élévation est **modérée** dans :*
- *le lupus érythémateux aigu disséminé*
- *le syndrome de Gougerot-Sjögren*
- *la sclérodermie diffuse et localisée*
- *les dermatopolymyosites*
- *la rectocolite ulcéro-hémorragique*
- *les leucémies*

*Son augmentation est **importante**, voire massive dans :*
- *les infections (principalement bactériennes)*
- *les nécroses tissulaires*
- *les traumatismes*
- *les maladies inflammatoires :*
  - *polyarthrite rhumatoïde*
  - *spondylarthrite ankylosante*
  - *rhumatisme psoriasique*
  - *rhumatisme post-streptococcique*
  - *vascularites*
  - *maladie de HORTON*

IV - 1 - 2 - L'haptoglobine

Sa fonction est de se lier à l'hémoglobine libérée par la destruction des érythrocytes dans un foyer inflammatoire et de la transporter jusqu'à la rate où le système des phagocytes mononucléés catabolisent à la fois l'hémoglobine et l'haptoglobine.

Son taux physiologique est d'environ **1 g/L** (0,6 - 1,6 g/L). Son élévation est nette et précoce (24 à 36 heures) en cas d'inflammation aiguë. Elle est également augmentée dans les cancers, les syndromes néphrotiques, les infarctus. Son taux est abaissé en cas d'insuffisance hépatique, d'hémolyse intra-vasculaire *in vivo* (anémie hémolytique) et *in vitro* (sérum hémolysé), et lors de la grossesse.

IV - 1 - 3 - Les autres protéines de phase aiguë

Nous ne ferons que citer les autres protéines de phase aiguë :

*- l'**orosomucoïde**, dont le pic est atteint en 2 à 3 jours en cas de syndrome inflammatoire*

*- le **fibrinogène**, dont la synthèse est hépatique et mégagaryocytaire. Son taux physiologique de 2 à 4 g/L est multiplié par 2 à 3 en cas de syndrome inflammatoire.*

*- les **fractions C3** et **C4** du complément dont la synthèse est principalement hépatique sont des protéines de phase aiguë. Il faut cependant garder à l'esprit que leur taux est le reflet de l'équilibre entre leur anabolisme et leur catabolisme. Un taux normal peut ainsi être le reflet d'une compensation entre un excès de synthèse (réponse de phase aiguë) et de consommation (complexes immuns).*

*- La protéine liant le mannose (**MBP** pour "mannose binding protein"), comme la CRP, reconnaît des structures sucrées plus spécifiquement exprimées par les procaryotes, conférant ainsi aux eucaryotes pluricellulaires un potentiel de discrimination large du non soi selon la composition en sucres. Elle est capable d'activer directement la voie classique du complément après son dépôt à la surface des micro-organismes qu'elle peut donc opsoniser, indirectement par l'intermédiaire du complément ou directement par des récepteurs*

spécifiques à la surface des cellules phagocytaires. L'importance de cette action est objectivée par les fréquentes et graves infections bactériennes qui émaillent l'existence des rares personnes ayant un déficit familial en MBP.

IV - 2. Le complément

Le complément est un système complexe de protéines plasmatiques dont l'activation en cascade génère de nombreux produits de clivage capables d'interagir avec des récepteurs cellulaires spécifiques responsables des nombreuses activités biologiques observées (voir cours spécifique).

IV-3. Les cytokines

Ces médiateurs solubles font l'objet d'un cours spécifique.

IV - 4 - Autres facteurs plasmatiques

D'autres substances plasmatiques sont douées de propriétés bactéricides. Nous avons déjà évoqué le **lysozyme** qui coupe les liaisons N-acétyl glucosamine et N-acétyl muramide des peptidoglycanes des parois des bactéries Gram positif. De même certains facteurs de la coagulation interagissent avec le système du complément.

V - MISE EN JEU DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE

La capacité d'un organisme multicellulaire à se défendre contre l'invasion par des pathogènes (bactéries, levures, parasites, levures…) dépend de son aptitude à mettre en place une réponse immunitaire. Tous les métazoaires ont des mécanismes de défense intrinsèques qui constituent **l'immunité innée**. Celle-ci repose sur la reconnaissance d'un large spectre de pathogène par des récepteurs **invariants**.

Les vertébrés y ajoutent une composante **spécifique, adaptative**, capable de distinguer les antigènes. Dans le tableau suivant sont répertoriées les principales différences entre les deux composantes de la réponse immunitaire :

Immunité innée	Immunité adaptative
Les pathogènes sont reconnus par des récepteurs codés **en configuration germinale**	Les pathogènes sont reconnus par des récepteurs générés par une **mécanique recombinatoire** au hasard
Spécificité **large** de reconnaissance : **PAMPs** (**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns) ou **MMAP** (**m**otifs **m**oléculaires **a**ssociés aux **p**athogènes)	Spécificité **fine** de reconnaissance : **épitope**
PAMPs : **polysaccharides** et **polynuclétides** présents et quasi invariants sur les pathogènes, mais absent chez l'hôte	Epitopes : principalement **polypeptides**, reflet de l'individualité du pathogène
Récepteurs : **PRR** (**p**attern **r**ecognition **r**eceptors)	Récepteurs : **BCR** et **TCR**
Réponse **immédiate**	**Délai** de réponse (3-5 jours)
Pas de mémoire	**Mémoire**
Chez tous les **métazoaires**	Que chez les **vertébrés**

V - 1 - Les PAMPs ou MMAP

Les pathogènes, plus particulièrement les procaryotes, possèdent des motifs moléculaires qui :

- sont non partagés avec leurs hôtes
- sont partagés avec de nombreux pathogènes apparentés
- sont relativement **invariants** (à la différence d'autres molécules comme l'hémagglutinine et la neuraminidase du virus de la grippe)
- sont le plus souven indispensables à la survie ou au pouvoir infectieux

De telles structures sont appelées **PAMPs** (**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns) ou **MMAP** (**m**otifs **m**oléculaires **a**ssociés aux **p**athogènes). On peut citer comme exemples :

- *la flagelline des flagelles des bactéries*
- *le petidoglycan des bactéries Gram positives*
- *le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives*
- *les acides lipotéchoïques*
- *l'ARN double brin (certains virus ont un génome constitué d'ARN double brin, et beaucoup d'autres n'ayant qu'un ARN simple brin passe par une étape transitoire à ARN double brin au cours de leur cycle réplicatif*
- *l'ADN déméthylé (à la différence des séquences CpG de l'ADN des eucarytotes)*
- *les peptides formylés possédant une N-formylméthionine (fMLP)*

V - 2 - Les PRRs

Il y a trois groupes de PRRs (**p**attern **r**ecognition **r**eceptors) :

- des molécules **sécrétées** qui circulent dans le sang et la lymphe
- des **récepteurs** de surface sur les cellules phagocytaires qui **lient** le pathogène avant son **ingestion**
- des **récepteurs** de surface dont la signalisation après liaison du pathogène aboutit à la libération de **molécules effectrices**

V - 2 - 1 - molécules sécrétées

On peut citer la **MBP** (**m**annose **b**inding **p**rotein, voir cours sur *le complément*, voie des lectines), qui va permettre de déposer du C3 sur les pathogènes (**opsonisation**) et d'enclencher la voie finale commune jusqu'au complexe d'attaque membranaire.

V - 2 - 2 - les récepteurs de phagocytose

Les macrophages possèdent des récepteurs qui reconnaissent certains PAMPs, notamment ceux contenant du mannose : quand un pathogène exprime sur l'extrémité terminale de ses chaînes sucrées un mannose, il peut se lier à ces PRR, et être plus facilement englobé dans un phagosome.

V - 2 - 3 - Toll-like receptors (TLRs)

Les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules épithéliales possèdent un jeu de protéines transmembranaires de type I (extrémité NH_2-terminale extracellulaire) qui reconnaissent différents type de PAMPs. Elles sont appelées **Toll-like receptors (TLRs)** car elles présentent une homologie avec une protéine décrite chez la drosophile, le récepteurs Toll.

Chez la mouche ce récepteur est impliqué dans les phénomènes de segmentaion chez l'embryon, et d'induction de défensine et de drosomycine (peptides anti-bactérien) en réponse aux infections par les levures et les bactéries Gram positives.

Les TLRs, qui possèdent en extra-cellulaire des séquences répétées riches en leucine, possèdent sur leur portion intra-cytoplasmique un domaine commun avec le récepteur de l'IL-1, qui lui permet d'interagir avec des protéines cytoplasmique qui possèdent toutes des domaines de mort (death domain).

Il existe un strict parallèlisme entre les voies d'activation chez l'homme et chez la drosophile, aboutissant chez l'homme à la translocation nucléaire du facteur NF-κB, responsable de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNFα) et de chimiokines.

On décrit au moins 9 TLRs chez l'homme, qui chacun reconnaissent un type différent de PAMPs, et dont d'ailleurs les gènes sont localisés sur des chromosomes distincts. Ceci est résumé sur le tableau suivant :

TLR	gène	ligand
TLR1	4p14	
TLR2	4q31.3-q5	Peptidoglycan des bactéries Gram positives
TLR3	4q31.3-q5	
TLR4	9q32-q33	LPS de la membrane externe des bactéries Gram négatives
TLR5	1q33.3-q42	flagelline
TLR6	4p14	
TLR7	Xp22	
TLR8	Xp22	
TLR9	3p21.3	CpG non méthylé de l'ADN

En jouant sur l'expression différentielle des TLR à la surface des différentes cellules, un organisme peut adapter sa réponse immunitaire naturelle à un pathogène donné.

Le plus souvent les TLR nécessitent une ou des molécules accessoires pour bien fixer le PAMP (exemple : le LPS se lie à la LPB [LPS binding protein], au CD14et à la protéine MD-2).

La signalisation enclenchée par les TLR partage des effecteurs communs avec les récepteurs de l'IL-1. Ceci est du à l'existence d'un domaine commun d'homolgie, appellé **TIR** (**T**oll/**I**L-1**R** homology). Les deux recrutent une molécule appelée MyD88, qui possède un tel

domaine, plus un domaine de mort qui lui permet de s'associer avec des thréonines kinases de la famille IRAK (IL-1R associated kinase). Le résulata ultime en est la dégradation du facteur I-κB, permettant la translocation dans le noyau du facteur de transcription NF-κB, impliqué dans la synthèse des cytokines.

La nature du TLR stimulé va conditionner le type de cytokines synthétisées, et par voie de conséquence, le type de réponse immunitaire spécifique. Ceci est notamment vrai pour l'engagement d'une réponse T vers les voies TH1 ou TH2.

Ainsi certaines mycobactéries déclenchent la synthèse d'IL-12 par les cellules dendritiques. Cela provoque une synthèse d'IFNγ par les cellules NK et les lymphocytes T conduisant à une réponse de type Th1 adaptée au développement de microorganismes intra-cellulaires.

V - 3 - LIEN RÉPONSE INNÉE/RÉPONSE ADAPTATIVE.

On voit donc que la frontière n'est pas si tranchée entre réponse immunitaire naturelle et réponse immunitaire spécifique. Il faut plutôt voir ces réponses comme un continuum, avec des situations intermédiaires représentées par les superantigènes T et B, les anticorps naturels, les cellules NK et les lymphocytes T γδ, dans lesquelles la reconnaissance est non clonale, mais cependant discriminante.

Certaines cellules, notamment les cellules dendritiques, sont capables d'établir un lien entre les deux lors de l'**initiation** d'une réponse immunitaire.

Les CD immatures de la périphérie n'ont pas la capacité de stimuler les cellules T de façon efficace. En effet, elles n'expriment pas, ou de faibles quantités, de molécules de CMH de classe II de surface ni de molécule de costimulation, indispensables à la stimulation des cellules T naïves. Les pathogènes ou des molécules associées aux pathogènes induisent la maturation des CD qui s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels majeurs transformant de façon coordonnée et séquentielle une cellule capturant l'antigène en une cellule présentant l'antigène. La maturation est intimement liée à la migration des CD des tissus vers les organes lymphoïdes. Nous venons de voir que la panoplie des TLR exprimés par ces cellules était capable d'orienter une réponse immunitaire.

A l'autre extrémité de la réponse, lors de la phase **effectrice** d'élimination de l'antigène, certains composants de la réponse immunitaire naturelle, tel que le complément, peuvent être recruté par les effecteurs de la réponse immunitaire adaptative pour en amplifier l'intensité.

V- LA RÉACTION INFLAMMATOIRE

Dès que le revêtement cutanéo-muqueux est franchi le micro-organisme est confronté aux systèmes de défense non spécifique des tissus sous-jacents. Il se constitue alors un foyer infectieux qui est la résultante de modifications induites de la microcirculation locale : vasodilatation brutale, conséquence du relargage par certaines cellules (mastocytes, plaquettes, polynucléaires ...) de médiateurs chimiques comme l'histamine, la sérotonine ou les kinines. Elles se matérialisent dans la **réaction inflammatoire**.

L'**inflammation** est définie par quatre piliers: **dolor, rubor, calor** et **tumor**, soit douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction. Elle est la conséquence de la vaso-dilation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire induites par les premières cellules phagocytaires qui ont ingéré le microorganisme. Ceci permet l'afflux des effecteurs (humoraux et cellulaires: complément, protéines de la phase aiguë de l'inflammation, polynucléaires et macrophages) de l'immunité naturelle puis ceux (anticorps et lymphocytes) de l'immunité acquise.

V-1. LA DIAPÉDÈSE

La réaction inflammatoire permet :

- d'une part l'**extravasation de protéines plasmatiques** qui vont participer à la défense (complément, immunoglobulines, protéine C réactive, fibrinogène, orosomucoïde ...)

- d'autre part un **afflux massif de leucocytes** qui est favorisé par certaines substances douées de pouvoir chimiotactique et soit d'origine bactérienne (peptides fMLP [formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine] des parois bactériennes), soit secondaires à la production locale de substances dérivées des kinines ou du complément (C3a, C5a) ou d'autres chémokines (IL-8 par exemple).

Le recrutement des cellules phagocytaires se fait par l'expression d'adhésines au niveau des cellules endothéliales et des polynucléaires. Le premier couple est constitué des P- et E-sélectines (CD62P et E) exprimées sur les cellules endothéliales, qui reconnaissent des structures sucrées sur les leucocytes (sialyl Lewis x). Cette première interaction est responsable d'une captation lâche des polynucléaires qui roulent sur l'endothélium. En l'absence de message d'activation transmis par un foyer inflammatoire tissulaire sous-jacent, le polynucléaire est relargué dans le courant circulatoire et poursuit sa route. A partir d'un foyer inflammatoire les molécules activatrices citées plus haut (chémoattractant) vont entraîner l'apparition de nouveaux couples d'adhésines responsables d'une adhérence plus forte. Il s'agit de 92 intégrines exprimées sur les leucocytes qui vont interagir avec leurs ligands spécifiques induits à la surface des cellules endothéliales. Ces derniers sont les molécules appelées ICAM ("inter-cellular adhesion molecules-1, -2 et -3) qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce contact fort et prolongé laisse le temps au leucocyte pour déverser le contenu de ses granules de type gélatinase. Cette dernière enzyme a pour substrat le collagène de type IV, principal constituant des membranes basales. Son action permet donc la digestion de la matrice extra-cellulaire et le passage du polynucléaire du sang vers les tissus, appelé ***diapédèse****.*

La différence fondamentale entre les mécanismes de défense non spécifique superficiels et profonds est que la mobilisation des effecteurs plasmatiques et cellulaires des défenses tissulaires s'accompagne le plus souvent d'une altération tissulaire symptomatique. L'existence de mécanismes de régulation tendant à limiter les dommages tissulaires et à restituer au plus vite l'intégrité tissulaire est parfois mise en défaut par des micro-oraganismes qui ont acquis des mécanismes de résistance aux effecteurs de la réaction inflammatoire. Il s'en suit alors de graves altérations tissulaires qui peuvent mettre en jeu le pronostic fonctionnel de l'organe en cause, voire le pronostic vital.

La réaction inflammatoire est la résultante de l'activation de différents systèmes : le complément, la coagulation, le système des kinines, les interférons, les plaquettes et les cellules phagocytaires professionnelles (polynucléaires neutrophiles, macrophages). Les quatre signes cardinaux de l'inflammation (rougeur, chaleur, douleur, oedème) s'accompagnent le plus souvent d'un cinquième qui est le dysfonctionnement de l'organe inflammé.

La réaction inflammatoire reposent sur les cellules phagocytaires qui sont recrutées séquentiellement, d'abord les polynucléaires puis les macrophages à partir des monocytes. Leur rôle est de détruire les micro-organismes par **phagocytose**.

V-2. La phagocytose

La phagocytose (du grec *phagein* : manger) se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps les agents infectieux doivent adhérer aux cellules phagocytaires qui les entourent de pseudopodes, avant de les internaliser

Des récepteurs de surface facilitent cette ingestion. Ils sont spécifiques de molécules qui fonctionnent comme des **opsonines** (du grec *opson* : aliment). Le dépôt d'anticorps (immunoglobulines) et de composant C3b sur les bactéries en facilitent l'ingestion par les phagocytes qui possèdent à leur surface des récepteurs pour le Fc des immunoglobulines et pour le C3b (CR1). D'autres molécules, dont la synthèse est induite au cours de la phase aiguë de l'inflammation, telles que la protéine C réactive ou la protéine liant le mannose (MBP) sont également douées de cette propriété d'opsonisation.

Après internalisation complète et formation d'une vacuole, appelée **phagosome**, englobant l'agent infectieux, on observe la fusion de ce dernier avec les granules lysosomiaux du phagocyte. Ces derniers contiennent des substances toxiques, bactéricides : enzymes protéolytiques (lysozyme, protéases), peptides cationiques (défensines, azurocidine, BPI ["bactericidal/permeability increasing protein"]), enzymes responsables de la production des dérivés toxiques oxygèno-dépendants (myéloperoxydase) et de la production des dérivés nitrés (NO synthétase).

V-3. Cytokines et inflammation

Les modèles expérimentaux chez la souris, confirmés depuis par les observations cliniques chez l'homme, permettent de classer ces cytokines en deux grandes catégories: les **cytokines pro-inflammatoires** ("Tumor necrosis alpha"/facteur de nécrose [TNF9], interleukine-1 [IL-1], IL-2, IL-6, IL-8, IFNs...) et les **cytokines anti-inflammatoires** (IL-4, IL-10, "Transforming growth factor bêta" [TGF9], Antagoniste du récepteur de l'IL-1 [IL-1-RA]). Le pléïomorphisme de la distribution cellulaire des récepteurs de ces différentes cytokines et les interactions multiples entre cytokines d'effets parfois opposés rendent compte de la majorité des symptômes observés au cours d'une réponse inflammatoire :

- la **fièvre** est due à l'action des principales cytokines inflammatoires (**TNF**9, **IL-1** et **IL-6**) aidées par la prostaglandine PGE2.
- les troubles métaboliques et l'**amaigrissement** sont plus le fait du **TNF**9 (appelée pour cela cachectine) et de l'**IL-6**.
- la **leucocytose** est secondaire à l'action endocrine des facteurs de croissance hématopoïétique que sont le **GM-CSF** et le **G-CSF** ("granulocyte/monocyte-colony stimulating factor" et "granulocyte-colony stimulating factor"), dont l'effet est d'augmenter la production médullaire des effecteurs phagocytaires recrutables au niveau du foyer inflammatoire.

V-4. La présentation de l'antigène

En outre les phagocytes mononucléés, à la différence des polynucléaires dont l'intervention précoce aboutit à la destruction totale de l'agent infectieux ingéré, sont capables de ne dégrader que partiellement ce dernier et d'en réexprimer à leur surface des peptides, présentés dans les poches des antigènes d'histocompatibilité de classe II. De tels complexes sont alors reconnus par les lymphocytes T $CD4^+$, et vont être à l'origine de la réponse immunitaire spécifique.

RÉSUMÉ

La première phase de réponse de l'hôte aux agressions par les micro-organismes pathogènes repose sur l'immunité naturelle ou innée. Ses mécanismes sont naturellement présents et prêts à défendre l'hôte contre un envahisseur à tout instant, mais incapables d'en garder le souvenir. Ils sont constitués par des mécanismes physiques, chimiques, écologiques, biologiques humoraux et cellulaires. Les surfaces épithéliales du corps constituent une première ligne de défense, agrémentées d'adaptations locales (cils, péristaltisme). Certains pathogènes ont développés des stratégies pour franchir cette première barrière. Ce faisant ils se trouvent confronter à une deuxième barrière qui reposent sur deux lignes de défense, immédiatement recrutables. En premier lieu, ils sont attaqués par la voie alterne du complément qui permet au mieux la lyse, à tout le moins leur opsonisation qui est le prérequis indispensable à la deuxième ligne, à savoir la phagocytose. Celle-ci est le fait de cellules professionnelles (macrophages, polynucléaires) équipées de récepteurs en conséquence (pour le fragment Fc des immunoglobulines, pour le complément).

Ces réponses reposent sur une distinction grossière, non-clonale, du soi et du non-soi, et se distinguent de l'immunité adaptative par leur incapacité à transmettre la mémoire de l'agression. Elles sont induites par des cytokines libérées par les macrophages qui ont trois actions: production par le foie de protéines de phase aiguë qui fonctionnent comme des opsonines, activant le complément après fixation sur la surface du pathogène; élévation de la température du corps, ce qui constitue un handicap pour la multiplication du pathogène; induction de l'inflammation qui modifie les propriétés de surface et la perméabilité des vaisseaux sanguins, ce qui permet le recrutement des phagocytes, des lymphocytes et de diverses molécules dans le foyer de l'infection. Les cellules infectées par des virus produisent des interférons qui inhibent la réplication virale et activent les cellules tueuses naturelles (NK), qui peuvent distinguer, de manière non restreinte par le CMH, les cellules infectées de celles qui ne le sont pas.

Tous ces mécanismes jouent un rôle important tant par eux-mêmes que par leur impact sur la réponse immunitaire adaptative qui leur fait suite;

POUR EN SAVOIR PLUS

REVILLARD JP. L'immunité innée *Médecine/Thérapeutique,* 2001, **7** : 313-317

TESTEZ-VOUS

🗁 - Les cytokines :

A - sont des composants du système du complément
B - sont des médiateurs de l'immunité cellulaire
C - sont synthétisées exclusivement par les lymphocytes et /ou les macrophages
D - agissent après liaison avec des récepteurs cellulaires spécifiques
E - sont pour certaines utilisées en thérapeutique

🗁 - L'immunité naturelle est :

A: spécifique de l'antigène
B: mise en jeu immédiatement
C: fait intervenir des cellules phagocytaires
D: repose sur l'action des lymphocytes
E: est exclusivement humorale

✒ - Parmi les cytokines énumérées ci-dessous quelles sont celles qui ont une activité pro-inflammatoire :

A - TNF9
B - IL-4
C - IL-1
D - IL-6
E - IL-7

✒ - Les propositions suivantes concernent les macrophages :

A - leurs cibles sont des pathogènes extra-cellulaires
B - ils appartiennent aux systèmes de défense de l'immunité spécifique, adaptative
C - ils produisent de l'IL-12
D - ils expriment le marqueur CD3
E - ils expriment peu de molécules HLA de classe 2 et de molécule B7 à l'état quiescent

✒ - Les Cellules NK

A - sont issues de macrophages
B - représentent 10 à 15 % des lymphocytes circulants
C - expriment le marqueur CD16
D - sont restreintes par les antigènes du CMH
E - sont inhibées par les antigènes du CMH

LES IMMUNOGLOBULINES

I. DEFINITION

II. OBTENTION DES IMMUNOGLOBULINES

III. STRUCTURE GENERALE DES IMMUNOGLOBULINES. NOMENCLATURE.

IV. STRUCTURE FINE DES CHAINES LEGERES ET LOURDES DES IMMUNOGLOBULINES.

IV.1. Chaînes légères.

IV.2. Chaînes lourdes.

IV.3. Notion de domaine et de superfamille des immunoglobulines.

V. CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES.

V.1. IgG.

V.1.1. Fragments obtenus par dégradation enzymatique.
V.1.1.1. La papaïne
V.1.1.2. La pepsine
V.1.2. Fragments obtenus par dégradation chimique.
V.1.3. Ponts disulfures.
V.1.4. Les sous-classes d'IgG

V.2. Les IgM.

V.2.1. La structure
V.2.2. La chaîne J
V.2.3. Relations structure/fonctions
V.2.4. Place de l'IgM dans la phylogénie et l'ontogénie
V.2.5. L'IgM membranaire

V.3. L'IgA.

V.3.1. L'IgA sérique.
V.3.2. L'IgA sécrétoire ou exocrine.

V.4. L'IgD.

V.5. L'IgE.

V.5.1. Historique et généralités
V.5.2. Structure
V.5.3. Propriétés.

V.5.4. Récepteurs pour le Fc des IgE (Fc1R)
V.5.4.1. Fc1RI
V.5.4.1. Fc1RII
V.5.5. Régulation de la synthèse des IgE

VI. ONTOGENIE DES IMMUNOGLOBULINES.

VII. LES DIFFERENTS NIVEAUX D'HETEROGENEITE DES IMMUNOGLOBULINES.

VII.1. L'ISOTYPIE.

VII.2. L'ALLOTYPIE.

VII.2.1. Le système Km (de Kappa marker, ex InV).
VII.2.2. Le système Gm (pour Gamma marker).
VII.2.3. Le marqueur A2m (pour Alpha2 marker).
VII.2.4. L'exclusion allélique ou haploïdie fonctionnelle.

VII.3. L'IDIOTYPIE.

VII.3.1. Découverte des idiotypes.
VII.3.2. Localisation des idiotypes.
VII.3.3. Exemples d'idiotypes publics
VII.3.3.1. Réponse anti-phosphorylcholine
VII.3.3.2. Réponse anti-9(113)dextrane
VII.3.3.3. facteurs rhumatoïdes
VII.3.4. Régulation idiotypique et théorie du réseau.

VII.4. CONCLUSION

VIII. RELATIONS ENTRE STRUCTURE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE.

VIII.1. PROPRIÉTÉS PORTÉES PAR LE FRAGMENT FAB DES IG: LE SITE ANTICORPS.

VIII.2. PROPRIÉTÉS PORTÉES PAR LE FRAGMENT FC.

VIII.2.1. Catabolisme.
VIII.2.2. Traversée du placenta.
VIII.2.3. Traversée des muqueuses.
VIII.2.4. Fixation du complément.
VIII.2.5. Fixation aux récepteurs des fragments Fc
VIII.2.6. Fixation du Fc à d'autres composants

IX. GENES DES IMMUNOGLOBULINES.

IX.1. ASPECTS CYTOLOGIQUES.

IX.2. ASPECTS BIOCHIMIQUES.

IX.3. ASPECTS GÉNÉTIQUES.

IX.3.1. Une chaîne polypeptidique : plusieurs gènes
IX.3.2. Les 3 groupes de translocation
IX.3.3. Les gènes d'Ig
IX.3.3.1. Gènes des chaînes légères
IX.3.3.2. Gènes des chaînes lourdes
IX.3.3.3. Mécanismes des réarrangements
IX.3.3.4. Diversité jonctionnelle
IX.3.3.5 Génération de la diversité
IX.3.3.6. Explication de l'exclusion allélique (ou haploïdie fonctionnelle)
IX.3.3.7. Mécanisme du "Switch"
IX.3.3.8. Formes membranaire et sécrétée des immunoglobulines
IX.3.3.9. Régulation de l'expression des gènes d'immunoglobulines
IX.3.4. Origine de la diversité des anticorps

X. SYNTHESE DES IMMUNOGLOBULINES

X - 1 - MÉTHODES D'ÉTUDE
X - 2 - RÉSULTATS

XI. PHYLOGÉNIE DES IMMUNOGLOBULINES

X.1. EVOLUTION DES IMMUNOGLOBULINES
X.2. SIMILITUDES ET DIFFERENCES
X.3. LES IGG SELON LES ESPECES

LES IMMUNOGLOBULINES : objectifs

Niveau A :

- **Distinction Ig membranaire/anticorps**
- **Structure du monomère d'IgG : H_2L_2**
- **Chaînes lourdes : 5 isotypes**
- **Chaînes légères : 2 isotypes**
- **Classes et sous-classes**
- **Notion de domaine**
- **Région constante, variable, charnière, hypervariable (CDR)**
- **Définition du site anticorps/paratope**
- **Produits des digestions enzymatiques**
- **Définition de isotypie, allotypie, idiotypie**
- **Exclusion allélique**
- **Propriétés biologiques du F(ab)**
- **Propriétés biologiques du Fc**
- **Principe de la diversité (recombinatoire, jonctionnelle, appariement), de la commutation, de l'expression membranaire ou secrétée**
- **Ontogénie des immunoglobulines**

Niveau B :

- **Sous-groupes de variabilité**
- **Ordre de réarrangement**
- **Superfamille des immunoglobulines**
- **Pourcentage de sucres**
- **PM**
- **Répartition intra/extra-vasculaire**
- **Particularités des autres isotypes qu'IgG**
- **valence anticorps**
- **définition des RFc type I, type II**
- **réseau idiotypique**
- **gènes V, D, J, C_H**
- **recombinase RAG1, RAG2**
- **rôle du CD40L dans la commutation**
- **production d'immunoglobulines par les lymphocytes, plasmocytes**

LES IMMUNOGLOBULINES

I. DEFINITION

Les **immunoglobulines (Ig)** sont des glycoprotéines douées d'activité **anticorps**, c'est-à-dire capables de se lier spécifiquement à un déterminant antigénique unique, ou épitope. Elles sont présentes dans le plasma, les liquides extra-vasculaires et les sécrétions. Elles sont produites par les **lymphocytes B,** mais seulement excrétées leur descendance **plasmocytaire**. Un lymphocyte B donné produit des Ig qui ne portent qu'**une seule spécificité** anticorps. Il est donc capable de ne reconnaître qu'un seul épitope, et ce pour toutes les étapes cellulaires de sa différenciation, jusqu'au stade ultime du plasmocyte sécréteur d'anticorps. Un adulte possède à un instant donné environ 10^{20} molécules d'Ig, dont plus de 10^{9} espèces moléculaires différentes.

Les anticorps sont les médiateurs de l'**immunité humorale**, dont les cibles sont **extra-cellulaires**. Ils remplissent leur rôle grâce à trois modes d'action:

- **neutralisation** des micro-organismes et de leurs toxines,
- **opsonisation** facilitant l'ingestion par les cellules phagocytaires (**phagocytose**)
- **activation** du **complément** conduisant à l'**opsonisation** et parfois la **lyse** des micro-organismes.

On retrouve les Ig principalement dans la fraction des gammaglobulines à l'électrophorèse des protéines.

Cependant leur hétérogénéité de charge (point isoélectrique variant de 5 à 9) explique une migration normale des alpha-2 globulines aux gammaglobulines.

Outre leur fonction anticorps spécifique, les Ig sont caractérisées par leur très grande **hétérogénéité** : il ne s'agit pas d'une espèce moléculaire homogène, facilement purifiable, comme l'albumine humaine. Au contraire, elles forment une vaste famille dont les membres sont doués de propriétés biologiques diverses en plus de la fonction anticorps. L'Ig présente une **dualité structurale** qui explique sa **dualité fonctionnelle**: elle possède deux extrémités variables identiques et propres à chaque Ig, et une portion constante définissant **cinq classes** principales: IgG, IgA, IgM, IgD et IgE, par ordre de concentration sérique décroissant. Les parties variables sont le support de l'activité anticorps, et une Ig monomère peut ainsi lier deux épitopes, alors que la partie constante est le support des propriétés biologiques des Ig.

Cette dualité est mise à profit dans le domaine diagnostique pour la détection et le dosage de nombreuses molécules, et dans le domaine thérapeutique pour cibler in vivo des structures antigéniques définies.

De plus, la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes B se fait selon deux modalités. Sous forme libre en solution, dans le sang et les liquides extra-vasculaires, elle est connue depuis longtemps sous le vocable d'**anticorps**. Ancrée à la membrane du lymphocyte B elle y est connue sous le nom d'**Ig membranaire**, et y participe à la formation du récepteur du lymphocyte B pour l'antigène (ou **BCR** pour "B cell receptor"). Les deux types de molécules ne diffèrent que par un court segment peptidique, qui sert précisément d'ancrage dans la membrane du lymphocyte B. La reconnaissance de l'antigène est ainsi assurée de façon identique par les deux formes de la molécule d'Ig.

II. OBTENTION DES IMMUNOGLOBULINES

On peut purifier et analyser les Ig extraites du sérum par différentes méthodes de biochimie préparative que nous nous contenterons d'énumérer ci-dessous:

- précipitation par les sels neutres,
- précipitation par l'alcool éthylique à froid,
- diverses modalités d'électrophorèse,
- chromatographie sur cellulose échangeuse d'ions,
- ultracentrifugation analytique et préparative,
- gel-filtration sur Séphadex®,
- immunoadsorbants.

La précipitation par le sulphate d'ammonium permet d'obtenir , à partir de nombreux donneurs, des immunoglobulines (fraction V de COHN) à usage thérapeutique (traitement substitutif des déficits, traitement immunomodulateur).

Ces diverses modalités techniques permettent très difficilement d'obtenir une préparation d'Ig rigoureusement homogène en quantité suffisante pour l'analyse fine, à partir du sérum humain normal ou même à partir de sérums d'animaux immunisés. En effet, la réponse physiologique à l'immunisation par un antigène possédant des épitopes différents est la production d'anticorps non homogènes issus de plusieurs familles ou clones de lymphocytes B et de leurs descendants plasmocytaires: l'antisérum obtenu est dit ***polyclonal****. Ces anticorps appartiennent à des classes et/ou des sous-classes différentes, leur force de liaison à l'antigène (affinité) est variable d'une molécule à l'autre. Il est donc difficile d'extraire une population rigoureusement homogène d'un tel sérum.*

La caractérisation de la structure des Ig par les nouvelles techniques de séquençage des protéines a pu se faire à la fin des années cinquante grâce à des "expériences de la nature" où un seul clone de lymphocyte B prolifère en dehors de tout contrôle et produit donc un seul type d'Ig, qui est dite ***monoclonale****. Cette situation se retrouve dans deux pathologies:*

- le ***myélome multiple*** *des os ou* ***maladie de KAHLER*** *dans lequel une prolifération maligne d'un clone de plasmocytes envahit la moelle osseuse, produit en très grande quantité une seule sorte d'Ig rigoureusement homogène et déprime la synthèse des autres Ig physiologiques, ce qui facilite la purification,*

- la ***macroglobulinémie*** *ou* ***maladie de WALDENSTRÖM*** *due à la prolifération d'un clone de lymphocytes B responsables de la synthèse en grande quantité d'une IgM monoclonale.*

De plus, on sait expérimentalement induire chez certaines souches pures de souris des tumeurs myélomateuses tout à fait comparables au myélome humain mais qui ont l'avantage d'être transplantables aux souris d'une même lignée, et même cultivables in vitro à volonté. Cette dernière propriété est à l'origine d'une technologie qui a pris un développement considérable depuis ses débuts en 1975 à la suite des travaux de KÖHLER et MILSTEIN: l'obtention des ***anticorps monoclonaux****. On a réussi à faire fusionner des cellules malignes myélomateuses entretenues en culture, avec des plasmocytes sains provenant de rates de souris immunisées par un antigène donné et, moyennant certains artifices de sélection, on sait isoler des clones hybrides produisant de manière quasi perpétuelle un anticorps homogène, monoclonal, de spécificité donné, in vitro. Cette méthodologie, dite des* ***hybridomes*** *a permis des études fines de structure d'Ig pures à ses débuts et est maintenant très largement utilisée comme outil diagnostique au laboratoire; elle est encore appelée à un avenir considérable en matière de diagnostic clinique, in vivo, pour une meilleure imagerie médicale, non sans compter les espoirs d'utilisation à des fins thérapeutiques en tant que vecteur spécifique de toxines ou de drogue anti-cancéreuses.*

Les différences des antisérums polyclonaux et monoclonaux sont précisée plus loin (VIII.4)

III. STRUCTURE GENERALE DES IMMUNOGLOBULINES. NOMENCLATURE.

L'essentiel des travaux ayant conduit à l'élucidation des éléments fondamentaux de la structure des Ig remontent aux années soixante, et ont valu le prix Nobel 1972 à PORTER et EDELMAN. C'est la molécule d'IgG1 qui a servi de modèle de description. Par des approches complémentaires, ces deux auteurs ont montré que la molécule d'IgG était un édifice ***symétrique****, constitué de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Le clivage par la papaïne, qui conduit à deux fragments Fab (pour "antigen binding") et un fragment Fc (pour "cristallisable") (cf, infra, V.1.1.1.), confirme la symétrie de la molécule par le fait que les deux sites de combinaison pour l'antigène sont identiques.*

Toutes les Ig, en dépit de leur très grande hétérogénéité, sont bâties sur un modèle de base commun, symétrique, celui de l'IgG monomère qui fut la première décrite. Leur poids moléculaire est d'environ **150 kD**. Elles comportent toutes 4 chaînes polypeptidiques groupées en deux paires identiques de taille inégale:

- d'une part **2 chaînes lourdes** dites **H**, pour "heavy", d'environ **50 kD**, d'environ **450** à **600** acides aminés.

- d'autre part **2 chaînes légères** dites **L**, pour "light", d'environ **25 kD,** d'environ **210** à **220** acides aminés.

Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs **ponts disulfures**. Les chaînes légères sont unies au chaînes lourdes par un pont disulfure très proche de leur extrémité carboxyterminale.

Les chaînes légères sont communes à l'ensemble des classes d'Ig, mais on en distingue 2 types antigéniquement différents: le type **kappa (**1**)** et le type **lambda (**1**)**. Il n'existe pas de différence fonctionnelle entre les deux types, mais la répartition au sein des espèces est variable: le rapport 1/1 est ainsi de 2:1 dans l'espèce humaine, de 20:1 chez la souris et de 1:20 chez les bovins. **Dans une molécule donnée d'Ig les deux chaînes légères sont toujours du même type:** il n'y a jamais de molécules hybrides, même dans les Ig monoclonales produites par des plasmocytes malins.

Les chaînes lourdes sont au contraire spécifiques pour chaque classe d'Ig: **cinq isotypes** (gamma [1], alpha [9], mu [1], delta [1] et epsilon [1]) définissent respectivement les **5 classes** d'Ig: **IgG, IgA, IgM, IgD** et **IgE**. Tous les individus de l'espèce humaine possèdent dans leur sérum des représentants des 5 classes d'Ig, d'ailleurs en concentrations à peu près identiques d'un individu à l'autre. C'est la définition de l'**isotypie**. Mais on peut distinguer au sein de l'espèce humaine des groupes d'individus qui se singularisent par des marqueurs propres de leurs Ig: les marqueurs **allotypiques** des Ig (cf VII.2).

IV. STRUCTURE FINE DES CHAINES LEGERES ET LOURDES DES IMMUNOGLOBULINES.

IV.1. Chaînes légères.

Leur étude structurale a été facilitée par leur obtention en grande quantité à partir de l'urine de certains malades atteints de formes particulières de myélome comportant une synthèse en large excès de chaînes légères. Le poids moléculaire de ces dernières (25 kD) est de beaucoup inférieur au seuil de filtration glomérulaire, expliquant leur passage facile dans les urines où elles sont responsables de la ***protéinurie de Bence Jones****.*

Au début des années soixante, de nombreuses chaînes légères, tant 1 *que* 1 *furent ainsi isolées. Leurs séquences primaires, c'est-à-dire l'enchaînement exacte des acides aminés constitutifs, furent déterminées.*

Les premières séquences de chaînes légères 1 *séquencées le furent en 1965 par Hilschman, à partir de deux patients présentant un myélome. Il montra que les deux chaînes, comportant environ 220 acides aminés, étaient quasi identiques sur la deuxième moitié (dite C-terminale) de leur longueur, alors qu'elles différaient profondément au niveau de leur première partie (dite N-terminale). Cette observation conduisit à la notion sans précédent dans l'histoire de cette toute jeune science qu'était la chimie des protéines, que ces chaînes comportait une portion variable et une portion constante.*

L'étude comparative des séquences obtenues, réalisée notamment par Hilschmann dès 1965, aboutit aux conclusions suivantes:

- les chaînes légères comportent généralement **214 acides aminés**, numérotés à partir de l'extrémité N-terminale,

- très peu de différences sont notées dans la moitié carboxyterminale de la chaîne. Cette moitié est dite **partie constante (CL)**. Elle renferme les acides aminés 108 à 214.

- en revanche les 107 premiers acides aminés diffèrent beaucoup d'une chaîne légère à l'autre; c'est la **partie variable (VL)**.

Les parties variables VL des chaînes légères 1 ne sont jamais associées aux parties constantes CL des chaînes légères 1, et vice versa. Il n'y a pas de molécules hybrides VκCλ ou VλCκ.

La disponibilité d'un grand nombre de séquences permit de constater qu'au sein de cette région variable il existait trois séquences de cinq à dix résidus où la variabilité était maximum. Ces trois zones sont désignées comme les **zones hypervariables** ou **CDR** pour "complementary determining region": en effet ces trois courtes séquences, éloignées dans la séquence primaire (acides aminés 28-35, 49-59 et 92-103) sont rapprochées dans l'espace par le repliement de la chaîne et participe à la formation du **site anticorps** ou **paratope** avec des séquences analogues sur l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde. Parce que la liaison du paratope de l'anticorps à l'épitope de l'antigène est stéréospécifique par complémentarité dans l'espace on parle de région déterminant la complémentarité ou CDR.

Pour apprécier la variabilité, on peut utiliser la formule de Wu et Kabat, qui est, pour une position donnée;

$$V = \frac{\text{nombre d'AA présents à une position donnée}}{\text{fréquence de l'AA le plus représenté à cette position}} \quad 11111111111111111111$$

la fréquence étant le nombre de fois où l'acide aminé (AA) le plus commun est retrouvé, divisée par le nombre de protéines examinées.

Ceci est une approximation qui ne tient pas compte du degré d'homologie entre les acides aminés substitutifs, ni du nombre de mutations pour passer d'un codon à un autre codon.

L'existence d'une variabilité pour les immunoglobulines répond à une finalité inverse de celle des autres protéines. En effet pour les autres protéines, les variations sont tolérées si elles ne perturbent pas la fonction: pour l'hémoglobine les sept acides aminés qui sont invariants sont ceux qui interagissent avec l'hème. Pour les immunoglobulines, la variabilité est la condition sine qua non de la fonction, c'est-à-dire de la reconnaissance de l'antigène qui peut être multiple.

Les trois CDR, appelés respectivement CDR1, CDR2 et CDR3 sont séparés par des régions plus longues, nettement moins variables, plus conservées qui constituent la **charpente** ou **"framework"** des parties variables. Cette charpente représente 80 % de la région VL. C'est à l'intérieur de ces régions charpentes, au nombre de 4, que se trouvent les acides aminés responsables du maintien de la cohésion dans l'espace de la région variable avec notamment neuf feuillets plissés 9.

Sur la base d'homologie de ces régions "framework" on a pu regrouper les diverses séquences des parties variables en **sous-groupes de variabilité**, 4 pour les chaînes légères 1 et 9 pour les chaînes 1.

*Les gènes V*1 *humains peuvent se subdiviser en quatre sous-groupes de variabilité principaux sur la base de la présence de certains acides aminés à certaines positions. Ces positions (2, 5 à 8, 11, 16, 23 et 24) sont occupées par des résidus invariants, en partie responsables de la conservation du redéploiement dans l'espace du domaine V*1*. Cette conservation de l'armature démontre l'origine commune des sous-groupes. La plupart des substitutions ne sont pas réparties au hasard dans chaque sous-groupe, mais au contraire sont liées.*

IV.2. Chaînes lourdes.

Le nombre de séquences complètes connues pour les chaînes lourdes est certes beaucoup moindre, mais leur analyse a permis d'aboutir à des conclusions tout à fait similaires. La chaîne 1 comporte **446 acides aminés**: elle est constituée de deux parties franchement inégales:

- les 3/4 du côté C-terminale ont une composition relativement invariante: c'est la **région constante**, dans ce cas **C**1. Ils sont constitués de trois segments successifs, comprenant chacun environ 110 acides aminés. Ces segments présentent entre eux des ressemblances dont l'implication sera discutée plus loin (cf IV.3). Entre le premier et le second segment de la

région constante se trouve un court segment d'une vingtaine d'acides aminés qui contient les ponts disulfures entre les chaînes lourdes et qui est appelé **région charnière**.

- en revanche le 1/4 du côté N-terminal est très variable d'une séquence à l'autre. C'est la **région variable** ou **VH**, qui tout comme son homologue VL possède **trois régions hypervariables** ou CDR situées sensiblement aux mêmes endroits que ceux de VL et séparées également par des régions charpentes plus conservées.

Les positions des acides aminés de ces différentes régions sont les suivantes:

région	*chaîne*	*position*	*boucle externe*	
FR1	*H*	*1-30*		
	L	*1-23*		
CDR1	*H*	*21-35*	*26-36*	
	L	*24-34*		*26-33*
FR2	*H*	*36-49*		
	L	*35-49*		
CDR2	*H*	*50-65*	*53-55*	
	L	*50-65*		*50-52*
FR3	*H*	*66-94*		
	L	*57-88*		
CDR3	*H*	*95-102*	*96-101*	
	L	*89-97*		*91-96*
FR4	*H*	*103-113*		
	L	*98-107*		

Les régions hypervariables forment, pour tout ou partie, des boucles externes qui apparaissent en protrusion par rapport au plancher des feuillets 9 des régions charpente. Elles constituent ainsi le paratope.

Les régions variables VH des chaînes lourdes sont également regroupées chez l'homme en quatre sous-groupes de variabilité, VH1 à VH4, sur la base d'homologies entre les régions charpente.

A la différence des chaînes légères, les diverses classes et sous-classes de chaînes lourdes partagent toutes les mêmes parties VH.

Le sous-groupe VHIII, tout comme la majorité des chaînes 1*, possède un acide aminé amino-terminal qui est un résidu glutamique non cyclisé.*

Le **site anticorps**, ou **paratope**, d'une Ig est constitué de l'association des régions VH et VL, et plus particulièrement des différents CDR (théorie du **site partagé**).

IV.3. NOTION DE DOMAINE ET DE SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES.

Les comparaisons, facilitées par l'emploi d'ordinateur, des séquences d'Ig (IgG en particulier, humaines et murines) montrent un fait fondamental: l'existence de nombreuses homologies, et ceci malgré la grande variabilité de la région N-terminale des chaînes. C'est ainsi qu'on retrouve des homologies entre les deux types de chaînes légères humaines, 1 *et* 1*, entre les chaînes* 1 *de différentes espèces telles que l'homme et la souris. Ces homologies sont si frappantes qu'on a pu faire l'hypothèse d'un gène primitif unique de 330 nucléotides, codant pour une chaîne ancestrale d'environ 110 acides aminés, qui se serait dupliqué de manière itérative au cours de l'évolution, acquérant ainsi une structure plus complexe et différenciée. Cette hypothèse a été pleinement vérifiée par les travaux d'EDELMAN et de son équipe qui ont séquencé la totalité d'une IgG humaine.*

Chaque région d'**homologie** (un segment de 110 acides aminés), VL, CL, VH, CH1, CH2 et CH3 forme un **domaine** compact stabilisé par un pont disulfure et possédant une

certaine autonomie thermodynamique. Sa masse moléculaire est d'environ 12 kD, et sa taille de 4x2,5x2,5 nm..

Par son hypothèse des domaines EDELMAN prévoyait que chaque région d'homologie, VL, CL, VH, CH1, CH2 et CH3, possède une structure tridimensionnelle autonome, lui permettant d'assurer une fonction précise, indépendamment de ses voisines. Dans ces conditions la sélection peut agir indépendamment sur chacun de ces domaines, favorisant ainsi l'émergence de fonctions spécialisées. Jumelée avec l'hypothèse d'évolution par duplications successives, l'hypothèse des domaines rend compte de l'indépendance des fonctions de reconnaissance de l'antigène et des fonctions effectrices. Globalement la molécule d'IgG apparaît donc comme un ensemble de douze domaines indépendants. A l'intérieur de chacun de ces domaines la chaîne polypeptidique est repliée selon une structure globulaire compacte, tandis qu'entre deux domaines adjacents, elle présent une certaine accessibilité, laissant éventuellement prise aux enzymes protéolytiques.

Chaque domaine est constitué de deux ensembles de feuillets plissés 9*; dans les régions variables VH et VL, ce sont les sites des trois tronçons anti-parallèles qui interagissent.*

Un domaine variable contient deux tronçons de feuillets plissés 9*, l'un de quatre et l'autre de cinq feuillets. Pour le domaine constant, ces chiffres sont respectivement de quatre et de trois. Les boucles, dites* 9*, qui relient ces feuillets* 9 *sont riches en glycine, ce qui augmente la flexibilité. Une cystéine dans chaque tronçon permet la formation d'un pont disulfure intra-domaine. Les chaînes latérales des acides aminés sont perpendiculaires au plan des feuillets* 9 *et font protrusion de chaque côté, créant ainsi une face hydrophobe et une face hydrophile. Les CDR correspondent le plus souvent aux boucles* 9*.*

L'hypothèse des domaines a été confirmée par les analyses chimiques: le site anticorps est formé par la réunion des deux domaines VL et VH: le domaine CH2 contient le site de fixation pour le premier composant du complément.

L'hypothèse des domaines prédit que chaque région d'homologie VH, VL, CH et CL possède une structure tridimensionnelle autonome : elle peut ainsi assurer une fonction précise, indépendamment de ses voisines. La sélection peut agir de façon autonome sur chacun de ces domaines, favorisant ainsi l'apparition de nouvelles fonctions spécialisées.

De telles homologies ne sont pas circonscrites qu'aux seules Ig. On retrouve en nombre variable des séquences homologues, soit aux régions variables et formant un cylindre tordu, soit aux régions constantes, et formant un cylindre droit, des chaînes lourdes ou légères dans de nombreuses molécules exprimées à la surface de différentes variétés de cellules du système immunitaire: chaînes 9 *et* 9 *du TCR, chaînes* 9 *et* 9 *de la molécule CD8, molécule CD4, chaînes* 1*,* 1 *et* 1 *de la molécule CD3, chaîne* 9 *et* 9_2*-microglobuline des antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), chaînes* 9 *et* 9 *des antigènes de classe II du CMH, molécules d'adhérence ICAM-1 et ICAM-2, etc...*

On regroupe toutes ces molécules au sein de la **superfamille des immunoglobulines**, car descendant probablement toutes d'un gène ancêtre commun codant pour un domaine primitif "Ig-like". Presque toutes ces molécules sont impliquées dans des phénomènes de reconnaissance moléculaire, soit dans le système immunitaire, soit dans le système nerveux. De plus beaucoup de membres de la superfamille interagissent avec d'autres membres.

V. CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES.

V.1. IgG.

C'est la première Ig dont la structure fut élucidée car c'est la plus abondante dans le sérum humain. Elle représente plus des trois quarts des Ig sériques.

Sa concentration physiologique moyenne est d'environ **12 g/L**, son poids moléculaire est de l'ordre de **160 kD** correspondant à un coefficient de sédimentation de 6,6 S en ultracentrifugation. Elle se présente sous forme de **monomère** et sa chaîne lourde 1 possède **trois domaines constants** et une **région charnière** individualisée, entre les bras de l'anticorps et la queue formée par les régions constantes.

*Cette région charnière, ou "hinge" en anglais, est flexible et permet à l'anticorps, qui est **bivalent**, de s'adapter pour permettre une meilleur congruence lors de la liaison de ses deux épitopes. La région charnière est riche en composants Ser, Pro et Thr qui lui confère sa **flexibilité**. On y retrouve des cystéines responsables des ponts disulfures intercaténaires entre chaînes lourdes.*

L'IgG ne possède qu'**une seule chaîne polysaccharidique** branchée sur le domaine CH2 en position 297, ne représentant que **2 à 3 %** du poids de la molécule.

La plupart des anticorps circulants appartiennent à cette classe que l'on retrouve dans le plasma et dans les fluides interstitiels. Sa répartition est à **60 % extra-vasculaire**. Les anticorps de classe IgG sont des anticorps opsonisants, fixant le complément et neutralisant les toxines bactériennes et les virus.

Sa structure précise, qui sert de modèle à la description des Ig, a été obtenue en grande partie grâce aux travaux de PORTER et EDELMAN, couronnés du prix Nobel en 1972.

V.1.1. Fragments obtenus par dégradation enzymatique.

V.1.1.1. La papaïne

La **papaïne** activée (PORTER) scinde l'IgG en trois fragments de taille voisine, en clivant la molécule au niveau de la région charnière, **avant les ponts disulfures** unissant les deux chaînes lourdes, au niveau de l'acide aminé 224:

- deux fragments identiques dits **Fab** pour **"Fragment antigen binding"**

car ils ont conservé le pouvoir anticorps ou à tout le moins la capacité de liaison à l'antigène. La découverte ultérieure de la structure en domaines des Ig permit de constater que chaque fragment Fab, porteur du site de liaison à l'antigène, était constitué par la réunion de l'intégralité de la chaîne légère et de la moitié N-terminale de la chaîne lourde, appelée Fd. La constitution du Fab est donc: VL-CL/VH-CH1.

- un fragment dit **Fc** (**fragment cristallisable** chez le lapin du moins),

dépourvu de toute activité anticorps et correspondant aux deux moitiés carboxyterminales des deux chaînes lourdes 1. *Il peut donc s'écrire: $(CH2\text{-}CH3)_2$. C'est grâce aux capacités de liaison de ce fragment Fc à différentes molécules et différents récepteurs cellulaires que s'expliquent les propriétés biologiques effectrices des Ig.*

V.1.1.2. La pepsine

La **pepsine**, enzyme animele quant à elle, scinde, à pH 5, la molécule d'IgG aussi dans la région charnière, mais **après les ponts disulfures** unissant les chaînes lourdes, au niveau de l'acide aminé 234. Il en résulte un seul gros fragment, appelé **$F(ab')_2$**, tandis que la moitié carboxyterminale restante est clivée en plusieurs peptides dont le plus volumineux est appelé **pFc**.

Le fragment $F(ab')_2$ est légèrement plus volumineux que deux Fab et se comporte pratiquement comme un anticorps entier: il possède deux sites de liaison à l'antigène et reste donc agglutinant et précipitant contrairement au Fab isolé, univalent, qui n'a que des propriétés inhibitrices. Cependant il perd toutes les propriétés biologiques, effectrices des Ig liées au fragment Fc. Il s'écrit $(VL\text{-}CL/VH\text{-}CH1)_2$.

On peut donc retenir la nomenclature suivante:

- **Fc** = $(CH2\text{-}CH3)_2$
- **Fab** = $VL\text{-}CL$ / $VH\text{-}CH1$ (monovalent)
- **$F(ab')_2$** = $(VL\text{-}CL$ / $VH\text{-}CH1)_2$-charnière (bivalent)
- **Fd** = $VH\text{-}CH1$
- **Fv** = $VL\text{-}VH$
- **pFc'** = $(CH3)_2$

Ce clivage de la molécule d'IgG par les enzymes a pleinement confirmé la dualité fonctionnelle de l'IgG qui s'explique par sa dualité structurale: activité anticorps d'un côté avec deux sites identiques et symétriques et, de l'autre, fonctions biologiques non anticorps diverses (passage transplacentaire, activation du complément, etc...) sur lesquelles nous reviendrons. Notons déjà que certaines de ces propriétés biologiques dépendantes du Fc n'apparaissent qu'après liaison de l'anticorps aux deux déterminants antigéniques correspondants.

V.1.2. Fragments obtenus par dégradation chimique.

Les agents réducteurs, comme le mercapto-éthanol ou le dithiotréitol en présence d'acide proprionique permettent de cliver les ponts disulfures entre les chaînes lourdes et les chaînes légères: les deux types de chaînes peuvent ensuite être séparées par gel-filtration. Les chaînes lourdes ont une masse moléculaire d'environ 50 kD alors que les chaînes légères ont une masse moléculaire de 25 kD.

*Le fragment Fab peut être réduit dans les mêmes conditions: on obtient la chaîne légère dans son entier d'une part, et la moitié aminoterminale de la chaîne lourde d'autre part, appelée **fragment Fd** et correspondant au VH-CH1.*

V.1.3. Ponts disulfures.

Il existe donc, comme nous l'avons vu, des ponts disulfures **intercaténaires**, entre les chaînes lourdes, et entre celles-ci et les chaînes légères, qui sont les cibles des agents réducteurs. En plus de ces liaisons covalentes la cohésion entre les chaînes est assurée par des liaisons faibles à courte distance (liaisons hydrogène, forces de VAN DER WALLS).

De plus existent, comme nous l'avons précédemment décrit, des ponts disulfures **intracaténaires** qui stabilisent les domaines de 110 acides aminés et qui sont eux résistants aux agents réducteurs dans les conditions expérimentales utilisées pour réduire les ponts intercaténaires qui sont plus exposés.

V.1.4.Les sous-classes d'IgG.

A partir de sérums de malades atteints de myélome IgG, on a préparé les Ig monoclonales pures et obtenu par immunisation d'animaux les anti-sérums correspondants. Grâce à ces réactifs correctement absorbés, KUNKEL a pu démonter qu'à l'intérieur de la grande classe des IgG humaines il existe en fait **quatre sous-classes** dont la structure et les propriétés diffèrent légèrement. Ces 4 sous-classes sont appelées **IgG1, IgG2, IgG3** et **IgG4** et sont définies par leurs chaînes lourdes: respectivement 1**1,** 1**2,** 1**3** et 1**4**. Tous les individus de l'espèce humaine possèdent ces 4 sous-classes d'IgG au même titre qu'ils possèdent toutes les classes d'Ig: ce sont des **isotypes**.

Les concentrations sériques de ces sous-classes ont longtemps été sujettes à controverse, la spécificité des anti-sérums polyclonaux dirigés contre elles n'étant pas toujours rigoureuse. Depuis l'obtention d'anti-sérums monoclonaux beaucoup plus spécifiques des dosages fiables, par technique immunoenzymatique, sont désormais disponibles, mais restent de réalisation confinée à des laboratoires spécialisés. Les taux sériques moyens sont les suivants: IgG1 = 9 g/L, IgG2 = 3 g/L, IgG3 = 1 g/L et IgG4 = 0,5 g/L. Il existe cependant d'importantes variations entre les sexes, notamment pour l'IgG4. La détermination de la répartition entre les sous-classes a de l'importance dans de rares cas de déficit de l'immunité humorale n'affectant que l'un ou l'autre des isotypes: ainsi des déficits isolés en IgG2 et IgG4 s'accompagnent d'infections sévères et récidivantes des voies aériennes alors que le taux global des IgG peut être dans les limites de la normale, les sous-classes restantes compensant les isotypes déficitaires.

*Les sous-classes diffèrent entre elles par le nombre de ponts disulfures intercaténaires: 2 pour les IgG1 et IgG4, 4 pour les IgG2 et 5 à 13 pour les IgG3. De ce grand nombre de ponts disulfures de l'IgG3 résulte une région charnière particulièrement longue et très sensible à la protéolyse: ceci expliquerait la demi-vie plus courte de cette sous-classe (7 jours) comparativement aux trois autres qui ont une demi-vie d'environ trois semaines. Le mode de liaison de la chaîne légère à la chaîne lourde diffère également entre les sous-classes: l'extrémité carboxyterminale de la chaîne légère (cystéine 213), donc l'extrémité de la région CL, est reliée à l'extrémité carboxyterminale du premier domaine constant CH1 de la chaîne lourde 1*1 *dans les IgG1 sur une cystéine en 220, alors que pour les trois autres sous-classes l'extrémité carboxyterminale de la chaîne légère est reliée à l'extrémité aminoterminale de ce domaine CH1, sur une cystéine en 131. Ces deux cystéines sur la chaîne lourde sont situées à égale distance de la cystéine en position 220 sur la chaîne CL, ce qui n'affecte pas le repliement dans l'espace.*

D'autre part, comme on le verra plus loin, à chaque sous-classes correspond un ou des marqueurs allotypiques précis. Enfin chaque sous-classe présente des propriétés biologiques spécifiques: **les IgG4 n'activent pas le complément** à la différence des trois autres, la fixation aux différents Fc1 récepteurs est variable selon les sous-classes. On peut d'ailleurs noté que cette sous-classe s'individualise aussi par un rapport 1/1 différent, de 4 à 5 pour 1, au lieu de 2 pour 1 pour les autres sous-classes.

V.2. LES IGM.

Les IgM existent sous deux formesmoléculaires :
- **pentamère** sérique
- **monomère** à la surface du lymphocyte B

V.2.1. La structure

Anciennement appelée bêta-macroglobuline, c'est la plus volumineuse des Ig sériques : son poids moléculaire est de **970 kD** avec un coefficient de sédimentation de 19 S, ce qui explique que sa répartition soit majoritairement (80 à 90 %) **intra-vasculaire**. Son taux sérique moyen est d'environ 1,6 g/L.

L'augmentation considérable de ce dernier au cours de la maladie de WALDENSTRÖM et la tendance de l'IgM a formé des polymères expliquent la relative fréquence du syndrome d'hyperviscosité aux conséquences neurologiques redoutables, nécessitant parfois des échanges plasmatiques, ou plasmaphérèses, en urgence.

La réduction de l'IgM sérique par le mercapto-éthanol montre que chaque molécule d'IgM est formée de **5 sous-unités** (ou monomères), reliés entre elles par des ponts disulfures au niveau du Cμ3: chaque sous-unité isolée conserve le pouvoir de se lier à l'antigène mais a perdu le pouvoir d'agglutiner. La **valence** de chaque monomère, constitué de deux chaînes lourdes μ et de deux chaînes légères, est de deux: théoriquement celle de la molécule entière d'IgM serait donc de **10**.

Cette valeur peut être effectivement retrouvée pour des haptènes de faible poids moléculaire: le plus souvent, pour des antigènes plus volumineux, en raison d'encombrement stérique, la valence de l'IgM oscille autour de 5. La faible affinité des sites anticorps des IgM est compensée par le caractère pentamérique de la molécule.

La chaîne lourde μ possède un domaine constant supplémentaire par rapport à la chaîne lourde 1: elle a donc un domaine variable et **4 domaines constants**. Ceci, ajouté au fait qu'elle possède aussi plus de résidus **polysaccharidiques** (**5** soit **12 %** du poids final de la molécule, un dans Cμ1, trois dans Cμ3 et un dans l'octodécapeptide), explique son poids moléculaire plus élevé, 65 kD. Le cinquième groupement est absent dans la forme membranaire. Contrairement aux IgG il n'existe **pas de région charnière individualisée** dans la chaîne lourde μ.

*En effet seul le domaine Cμ2 ne possède pas d'homologie avec les domaines C*1 *(jusqu'à 40 % pour les trois autres). Cependant le deuxième domaine constant, Cμ2, est doué d'une certaine flexibilité et peut faire office de région charnière.*

A l'extrémité carboxyterminale existe un **octodécapeptide** (18 acides aminés) supplémentaire également présent dans la chaîne 9: une cystéine en avant-dernière position permet la liaison à une petite glycoprotéine de 15 kD et 137 acides aminés, appelée **chaîne J** (pour "joining"), dont l'unique fonction est d'assurer la polymérisation des Ig.

V.2.2. La chaîne J

Le gène de la chaîne J est porté par un chromosome différent (**chromosome 4**) de ceux des gènes des Ig et ne subit **aucun réarrangement** au cours de la différenciation du lymphocyte B contrairement à ceux-ci. La régulation, par les cytokines, de sa transcription est indépendante de celle des Ig. Seuls les isotypes μ et 9 possédant l'octodécapeptide supplémentaire avec la cystéine en avant-dernière position sont capables de se présenter physiologiquement sous forme de polymères. La chaîne J contient 129 acides aminés, a un pI très acide en raison de nombreux acides aminés chargés négativement, renferme huit cystéines et ne présente **aucune homologie avec les Ig**: elle n'appartient pas à la superfamille des Ig.

On ne sait pas encore exactement si l'unique chaîne J unit deux chaînes lourdes μ appartenant à deux monomères différents ou bien au contraire aux deux chaînes lourdes d'un même monomère. L'établissement du pont entre la chaîne μ ou 9 *avec la chaîne J est réalisé par une enzyme polymérisante localisée immédiatement en sous-membranaire, qui fonctionne comme une* ***sulfhydril oxydase.***

V.2.3. Relations structure/fonctions

La forme particulière de cette molécule d'IgM, hérissée de 10 Fab, lui confère un remarquable pouvoir **agglutinant**, de loin supérieur à celui des IgG. De même, son pouvoir **lytique**, lié l'activation du complément, est très puissant: ceci s'explique par les contraintes spatiales pour l'activation du premier composant (C1q) du complément.

En effet il est nécessaire que ce dernier soit simultanément lié à deux monomères d'Ig pour être activé: la distance entre deux sous-unités du pentamère IgM correspond juste à l'encombrement du composant C1q du complément qui se trouvera donc immédiatement activé dès sa liaison, alors qu'il lui faudra trouver deux IgG déposées à la surface d'un micro-organisme ou d'un complexe immun et éloignées de la distance requise pour pouvoir accomplir sa fonction.

Ces deux propriétés, **fort pouvoir agglutinant** et **forte activation du complément**, ajoutées à la localisation principalement intra-vasculaire de l'IgM, expliquent que les anticorps de cette classe soient particulièrement adaptés pour lutter contre la dissémination par voie sanguine des micro-organismes, réponse qui doit être rapide pour éviter les conséquences néfastes d'une septicémie.

V.2.4. Place des IgM dans la phylogénie et l'ontogénie

Les premiers anticorps qui apparaissent après une primo-immunisation sont de classe IgM. Ils cèdent généralement la place aux anticorps de classe IgG, plus abondants et plus durables. La connaissance de ce changement de classe, appelé aussi **commutation isotypique** ou **"switch"** en anglais a des implications diagnostiques; par exemple la découverte, chez une femme enceinte, d'une première sérologie de rubéole positive au cours du premier trimestre de la grossesse impose la séparation des anticorps de classe IgM de ceux de classe IgG pour savoir si l'on est en présence d'une affection virale récente ou ancienne, ce qui n'a pas les mêmes conséquences thérapeutiques. Dans certaines circonstances les anticorps restent toute la vie de classe IgM: c'est le cas des agglutinines naturelles anti-A et anti-B du système des groupes sanguins ABO, et plus généralement des antigènes thymo-indépendants.

Les IgM représentent la forme la plus ancienne des anticorps crée par les vertébrés, alors que les autres classes d'immunoglobulines sont d'apparition plus récente au cours de la phylogenèse. Les IgM n'ont **pas de sous-classes ni de marqueurs allotypiques**. Les IgM sont également la première classe d'immunoglobulines à apparaître chez le nouveau-né (cf VI). **L'ontogenèse répète la phylogenèse**.

V.2.5. Les IgM membranaires

A la surface du lymphocyte B, l'IgM est la **principale Ig membranaire** où sa fonction est celle de récepteur de l'antigène. Dans le sang du cordon du nouveau-né 90 % des lymphocytes B sont porteurs d'une IgM membranaire. Celle-ci est sous forme de monomère avec une structure légèrement différente dans son extrémité carboxyterminale, comparativement à la forme sécrétée: il existe en effet 41 acides aminés supplémentaires dont 25 composent un segment hydrophobe d'ancrage dans la membrane plasmique.

Nous verrons ultérieurement comment se fait la commande génétique qui préside au choix entre forme sécrétée et membranaire de l'IgM (cf IX-3-3-9).

V.3. L'IgA.

L'IgA est caractérisée par hétérogénéité de ses formes moléculaires de présentation. Dans l'espèce humaine on distingue deux compartiments, distinctement

cloisonnés, dans lesquels la répartition et la fonction des IgA sont différentes: le compartiment systémique ou **sérique** et le compartiment **muqueux**.

V.3.1. L'IgA sérique.

Elle constitue la deuxième classe d'Ig sérique après les IgG, puisqu'elle représente environ 10 % du total des Ig avec un taux moyen de 2 à 3 g/L. Malgré cela on connaît peu d'anticorps sérique de classe IgA. Les fonctions de l'IgA sérique restent mystérieuses. Elle se présente principalement sous forme de monomères, avec un coefficient de sédimentation de 7 S, un poids moléculaire de **160 kD**. Elle est bâtie sur le modèle général avec deux chaînes lourdes 9, qui ont **trois domaines constants**, et deux chaînes légères, 1 plus souvent que 1. En cas de myélome IgA on observe souvent des formes dimères, voire de degré de polymérisation supérieur, comportant alors souvent une chaîne J de jonction.

On connaît **deux sous-classes** d'IgA: l'**IgA1** et l'**IgA2**. Dans le sérum l'IgA1 est l'isotype de loin majoritaire (80 %), ce qui n'est plus le cas au niveau muqueux comme nous allons le voir.

Les différences entre les sous-classes concernent la longueur, la chaîne 91 étant plus courte de 4 kD: cependant au niveau de la région charnière, codée au tout début du domaine C92, la chaîne 91 est plus longue de 13 acides aminés dont certaines liaisons peptidiques sont susceptibles au clivage par des protéases spécifiques de certains germes, Streptococcus, Neisseria, expliquant ainsi la meilleure résistance de l'IgA2 au niveau de laquelle cette région manque. L'IgA est nettement plus riche que l'IgG en sucres, avec une prédominance pour l'IgA1 (7 chaînes polysaccharidiques) comparativement à l'IgA2 (4 à 5): de plus la composition diffère entre les sous-classes puisqu'au niveau des 13 acides aminés uniques de la région charnière de l'IgA1 se branchent par des liaisons dites de type O des sucres contenant de la galactosamine qui n'est donc pas présente dans la molécule d'IgA2. Rappelons que la glycosylation des protéines se fait dans l'appareil de GOLGI par fixation des glucides soit sur le résidu amide de l'asparagine (N-glycosylation), soit le groupement hydroxyle des sérine, thréonine ou hydroxylysine (O-glycosylation).

La sous-classe IgA2 présente un polymorphisme allélique avec **deux allotypes**, **A2m(1)** et **A2m(2)** (cf, infra).

Les molécules IgA d'allotype A2m(1) présente l'originalité d'avoir des chaînes légères qui ne sont pas reliées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures, mais sont reliées entre elles par un pont disulfure, expliquant qu'en présence d'urée ou de guanidine mais sans recours à un agent réducteur de type bêta-mercapto-éthanol on peut dissocier un dimère de chaînes lourdes et un dimère de chaînes légères.

On retrouve à l'extrémité C-terminale de l'IgA le même octodécapeptide que celui retrouvé à la même position sur la chaîne μ, qui sert de point d'ancrage à la chaîne J, et donc à la polymérisation.

V.3.2. L'IgA sécrétoire ou exocrine.

C'est l'Ig principale des sécrétions salivaires, lacrymales, nasales, bronchiques, gastro-intestinales et mammaires. Elle est synthétisée par les nombreux plasmocytes présents dans les chorions des muqueuses où les plasmocytes à IgA prédominent (rapport IgA/IgM = 20/1). Les muqueuses représentent **400 m^2** de contact avec l'extérieur et sont la principale porte d'entrée des microbes. C'est dire le rôle fondamental de l'IgA exocrine qui peut être comparée à une peinture immunologique de protection muqueuse, fonctionnant comme une première barrière de défense vis-à-vis des substances étrangères ingérées ou inhalées: l'importance de la superficie explique aussi, vu la prédominance de l'IgA à ce niveau, le très net déséquilibre en faveur de cet isotype dans la synthèse quotidienne des Ig (IgA = 66 mg/kg/jour, IgG = 30 mg/kg/jour et IgM = 8 mg/kg/jour). Les principales sécrétions contenant

de l'IgA sécrétoire sont les larmes, la salive, le liquide nasal, le liquide bronchique, la bile, le colostrum, le lait, les sécrétions intestinales et génitales.

La structure de l'IgA sécrétoire diffère de celle de l'IgA sérique: son coefficient de sédimentation est de 11 S et son poids moléculaire de **400 kD**. Elle est en effet constituée de **deux monomères d'IgA 7 S** reliés par une **chaîne J** et comporte une chaîne glycoprotéique supplémentaire: le **composant sécrétoire** ou **pièce sécrétoire**. Cette dernière n'est pas synthétisée par les plasmocytes, contrairement aux monomères d'IgA et à la chaîne J, mais par **les cellules épithéliales**. Sa synthèse est indépendante de celle des Ig; on la retrouve d'ailleurs en assez grande quantité dans les sécrétions des sujets atteints d'agammaglobulinémie. Elle sert de récepteur aux Ig polymériques (IgA, IgM) et est aussi connu sous le nom de **récepteur des Ig polymériques**.

Elle est exprimée au pôle basal des cellules épithéliales: sa portion extra-cellulaire possède cinq domaines apparentés aux Ig: elle appartient à la superfamille des Ig. Qu'elle ait lié son ligand ou non, elle est internalisée dans des vésicules d'endocytose et, par un mécanisme de transcytose, elle est adressée au pôle apical de la cellule épithéliale où elle est réexprimée à la membrane après fusion des vésicules avec cette dernière. Des protéases non spécifiques clivent la portion extra-cellulaire du composant sécrétoire lié ou non à son ligand et le déverse dans la lumière. La pièce sécrétoire semble conférer au dimère d'IgA une résistance aux enzymes protéolytiques sécrétées par les nombreuses bactéries présentes et permet ainsi à cet anticorps particulier d'accomplir ses fonctions dans une atmosphère hostile.

Outre le degré de polymérisation, la répartition en sous-classes différencie le compartiment muqueux du compartiment systémique: en effet, pour les mêmes raisons d'adaptation à des microbes pathogènes sécréteurs de protéases spécifiques des IgA1, l'organisme a répondu en privilégiant la réponse de type IgA2 au niveau muqueux: le rapport entre les sous-classes y est en effet d'environ 50/50. Par contre la demi-vie des deux formes d'IgA diffère très peu et est de l'ordre de 5,8 jours.

De même, quelles que soient l'origine et la sous-classe, l'IgA est **incapable d'activer le complément** par sa voie d'activation classique, ce qui au niveau muqueux est une adaptation bénéfique aux conditions de travail de l'IgA sécrétoire.

Physiologiquement le complément n'est pas présent dans les sécrétions muqueuses, et quand bien même il y serait, en pathologie, son activation pourrait aboutir à la lyse des cellules épithéliales et donc à la rupture de la barrière cellulaire épithéliale qui est le premier mécanisme de défense contre la pénétration des micro-organismes à ce niveau.

V.4. L'IgD.

Cette quatrième classe d'Ig a été découverte la première fois par Rowe chez un sujet atteint de myélome dont l'Ig monoclonale n'appartenait à aucune des trois classes connues jusqu'alors (IgG, IgA et IgM). Ceci a permis de préparer un anti-sérum spécifique et de s'apercevoir que cette nouvelle classe existait chez tous les individus.

Son taux physiologique sérique est très faible : dans l'espèce humaine sa distribution est trimodale (0,1 ; 0,01 et 0,001 g/L) avec une moyenne de 0,03 g/L, soit 300 fois moins que l'IgG. L'IgD a un poids moléculaire de **184 kD** avec une constante de sédimentation de 7 S. Sa structure biochimique est semblable au modèle des Ig monomères: 2 chaînes lourdes 1 unies à deux chaînes légères plus souvent 1 que 1. La chaîne lourde 1, qui n'a pourtant que **trois domaines constants,** a un poids moléculaire de 70 kD, supérieur à celui de la chaîne lourde μ qui en a quatre. Ceci s'explique par l'importance de la glycosylation (6 à 7 résidus polysaccharidiques représentant 9 à 14 % du poids moléculaire) et par une région charnière particulièrement longue, qui explique par ailleurs la grande susceptibilité à la protéolyse de l'IgD.

Cette région charnière de 64 acides aminés est constituée de deux parties. La première est riche en alanine et en thréonine, et contient quatre ou cinq groupements prosthétiques, branchés par une liaison de

*type O-galactosyl sur une sérine ou sur une thréonine et responsable de la liaison à la lectine jacaline (cf VII-2-6). La seconde moitié est riche en acide glutamique et en lysine et est très sensible à la protéolyse. Le domaine C*1*3 est également très inhabituel: il ne possède pas les résidus proline habituellement retrouvés entre les segments parallèles et anti-parallèles des feuillets plissés* 9*, ce qui lui confère une conformation globale différente des autres domaines.*

L'IgD est principalement retrouvée dans le compartiment **intra-vasculaire** (75 %), comme l'IgM: son catabolisme est rapide avec une demi-vie de 2,8 jours.

Ses activités biologiques en tant qu'Ig sérique paraissent très modestes: on commence à identifier des anticorps de classe IgD (anti-virus, -haptène, - allergène, -auto-antigène). Elle ne fixe pas le complément, ne traverse pas le placenta.

C'est au niveau cellulaire que cette classe d'Ig paraît jouer un rôle fondamental. On la retrouve fréquemment à la surface des lymphocytes B en association avec des IgM monomères. Elles ont la même région variable V_H et la même chaîne légère, ce que la génétique explique (cf IX-3-3-7). Les **IgD membranaires** (ou sIgD) sont soit transmembranaires, soit ancrées à la surface des lymphocytes B par une liaison glycosyl-phosphatidylinositol (GPI).

V.5. L'IgE.

V.5.1. Historique et généralités

*L'IgE a été découverte par Ishizaka entre 1966 et 1970. Cet auteur travaillait sur l'antigène E du ragweed (plante sauvage poussant très facilement sur les bords des routes, les chantiers désaffectés aux USA, nettement plus rare en France où elle est connue sous le nom d'ambroisie). Cet antigène E était bien connu pour être allergisant chez un assez grand nombre de sujets américains. Il montrait que l'activité anti-ragweed pouvait être éliminée par un antisérum anti-humain total, et non par chacun des autres antisérums spécifiques des chaînes lourdes connues à l'époque (*1*,* 1*,* 9 *et* 1*). Donc il suggérait qu'une autre classe était en cause, baptisée E. Par la suite, Ishizaka a réalisé des échanges avec des chercheurs suédois, Johansonn et Bennich, qui venaient de découvrir un myélome d'une nouvelle classe qu'ils avaient baptisé ND (Non Déterminé). Grâce à ce très rare cas de myélome à IgE, les études sur la structure de ce nouvel isotype ont pu avancer. Depuis on a trouvé une lignée de rats belges (Lou pour Louvain), atteints de plasmocytome à IgE, qui ont permis des études de structure dans cette espèce.*

L'IgE est la moins abondante des Ig: chez l'adulte normal, son taux physiologique moyen est très faible (0,0001 g/L, soit **100 µg/L**, soit 100 à 200 unités internationales). Ceci représente un taux 100 000 fois moindre que la concentration physiologique des IgG, et pourtant c'est sans doute la classe d'Ig qui intéresse le plus les Allergologues.

En effet sa concentration sérique peut être fort augmentée dans les maladies atopiques, mais aussi et souvent plus dans certaines parasitoses (Helminthiases). Après interactions de leur fragment constant avec un récepteur de faible affinité (CD23, cf infra), présent sur des cellules cytotoxiques (polynucléaires éosinophiles, lymphocytes), elle participe à l'élimination des parasites.

Malgré leur très faible concentration sérique, les IgE jouent un rôle considérable dans les manifestations d'**hypersensibilité immédiate**, telles que le choc anaphylactique, le rhume des foins, l'asthme.

Les dosages de ces faibles concentrations ne sont pas accessibles aux méthodes chimiques classiques, ni à la néphélémétrie utilisée en pratique courante pour le dosage des IgG, IgA et IgM: ils font appel à des méthodes radioimmmunologiques ou immunoenzymatiques.

V.5.2. Structure

Sa structure est celle d'un monomère avec 2 chaînes lourdes 1 et deux chaînes légères.

Le rapport des chaînes légères est de 60 % 1 / 40 % 1 .

Tout comme la chaîne µ la chaîne lourde 1 possède **4 domaines constants** ce qui explique son poids moléculaire de 72 kD, correspondant à environ 540 résidus, et celui de **188 kD** pour l'IgE. De même elle ne possède **pas de région charnière**. Elle contient 13 % de sucres (6 résidus polysaccharidiques: 3 sur C11, 1 sur C12, 2 sur C13).

La répartition des ponts disulfures est originale dans les IgE: outre les ponts intra-caténaires usuels de chaque domaine, on retrouve un pont intra-caténaire supplémentaire dans le domaine C1 entre les cystéines 128 et 215. Ce pont est également présent dans les chaînes 9 de l'homme et du lapin. De plus, et de manière spécifique aux chaînes lourdes 1, il existe deux ponts intercaténaires entre d'une part les domaines C1 d'une chaîne et C12 de l'autre, et entre les domaines C12 et C13 d'autre part.

V.5.3. Propriétés.

Sa demi-vie est très brève: 2,5 jours dans le sérum, donc la plus brève de toutes les Ig. Mais on sait que l'IgE fixée aux mastocytes et aux polynucléaires basophiles est beaucoup plus protégée de la destruction catabolique et a une demi-vie de plusieurs semaines, voire de plusieurs mois. Il est pratiquement impossible de chiffrer la quantité d'IgE fixée aux cellules.

A la différence des autres isotypes d'Ig, qui sont thermostables, l'IgE est **thermolabile:** elle est fonctionnellement détruite par un chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

L'IgE ne fixe pas le complément par la voie classique.

L'IgE ne traverse pas le placenta.

La propriété la plus intéressante de l'IgE est certainement sa **cytophilie** par le biais de son fragment Fc. L'IgE n'est pas hétérocytotrope, contrairement à certaines sous-classes d'IgG qui sont capables de se fixer à la peau de cobaye. Par contre elle est capable de se fixer à certaines cellules humaines: elle est dite **homocytotrope**. Cette fixation cellulaire est sous la dépendance de récepteurs spécifiques pour le Fc des IgE.

V.5.4. Récepteurs pour le Fc des IgE (Fc1R)

On en connaît deux types principaux;

V.5.4.1. Fc1RI

C'est un récepteur de **forte affinité** présent sur les polynucléaires basophiles, éosinophiles, les mastocytes et les cellules de Langerhans. Il est formé de quatre chaînes:

- une longue chaîne extra-membranaire 9, qui appartient à la superfamille des Ig, c'est-à-dire qu'on y reconnaît une structure à deux domaines. C'est à ce niveau que se situe le site de liaison avec le Fc1, plus précisément au niveau des domaines constants C12-C13 (acides aminés 301 à 306)

- une chaîne 9 avec quatre segments trans-membranaires

- et deux chaînes 1, homodimères, réunies par un pont disulfure au niveau du très court segment extra-membranaire, tandis que la région cytoplasmique est nettement plus longue. Cette chaîne 1 a la même

structure et les mêmes fonctions que la chaîne Zéta (ζ) du complexe moléculaire CD3 associé au récepteur T pour l'antigène.

Les régions cytoplasmiques des chaînes alpha et bêta possèdent, comme la chaîne zéta un ou plusieurs motifs de liaison aux protéines tyrosines kinases. Il est intéressant de constater que l'on trouve 7 traversées membranaires pour la totalité des chaînes de ce récepteur, fait qui se produit également pour les récepteurs associés aux protéines G. Il apparaît donc qu'en biologie cellulaire cette traversée répétée 7 fois, ait un intérêt particulier.

Ce récepteur fixe avec une forte affinité l'IgE par son fragment Fc à l'état monomère. La cellule basophile est hérissée à sa surface de ces milliers de récepteurs FcεRI, chacun d'entre eux ayant lié éventuellement les molécules d'IgE sécrétées par des plasmocytes avoisinants, se trouve postée en quelque sorte en attente d'allergène multivalent. Lorsque un certain nombre d'épitopes sont simultanément reconnus par ces IgE de surface, se produit un phénomène de pontage qui déclenche l'activation cellulaire dont la résultante principale est la dégranulation des cellules basophiles, libérant ensuite dans le milieu leurs amines vaso-actives.

On a pu démontrer que l'invalidation génétique touchant les gènes de la chaîne alpha chez la souris (souris knock-out) empêche l'expression des réactions anaphylactiques cutanées ou généralisées.

V.5.4.2. FcεRII

Le récepteur de **type II** est dit de faible affinité.

Il est également désigné sous le nom de **CD23**, il est présent sur divers types cellulaires en particulier les monocytes/macrophages, les éosinophiles hypodenses, les plaquettes mais aussi les mastocytes, les basophiles, les lymphocytes T et B, les cellules de Langerhans. Son expression cellulaire augmente après l'activation. Outre les IgE, le CD23, sur les cellules folliculaires dendritiques, est capable de se lier au CD21 (ou CR2) exprimé à la surface des lymphocytes B (voir cours différenciation B).

Il existe sous deux iso-formes a et b qui diffèrent par leur région cytoplasmique (b a une portion cytoplasmique nettement plus longue que a). La portion extra-cellulaire bien développée comprend un domaine de 120 amino-acides homologue à celui des lectines animales calcium-dépendantes. Ce domaine constitue le site de liaison à l'IgE au niveau du Cε3 (acides aminés 367-370). Près de la surface cellulaire ce segment extra-cellulaire comporte une région facilement clivée : l'auto-protéolyse progressive du FcεRII est à l'origine de fragments solubles libérés dans l'environnement de la cellule désignée FcεRII/CD23 soluble ou IgE Binding Factor (IgE BF) car conservant le domaine lectinique, ils sont capables de se lier à l'IgE. On sait que le dosage du CD23 soluble est actuellement assez couramment pratiqué.

L'affinité de ce type de récepteur pour son ligand est moindre que celle du FcεRI

Surtout il est incapable de lier l'IgE monomère ; il ne peut le faire que pour l'IgE complexée sous forme de complexes anticorps-allergènes ou de plusieurs molécules d'IgE agrégées. C'est l'interaction multivalente de l'IgE qui génère le signal d'activation cellulaire comme on l'a vu pour FcεRI.

V 5.5- Régulation de la synthèse de l'IgE

*Après la découverte et l'isolement de l'IgE (1966-1970) les ISHIZAKA ont consacré les quinze années suivantes à l'étude approfondie, surtout chez le rat et la souris, des mécanismes régulateurs des réponses anticorps de classe IgE. Il a été rapidement reconnu que cette réponse IgE est hautement **T-dépendante** et qu'il existe une franche dissociation entre la réponse classique de type IgG et celle de type IgE ; cette dissociation dépend de nombreux paramètres :*

- c'est ainsi que le vaccin anti-coquelucheux et le gel d'hydroxyde d'aluminium sont de très bons adjuvants pour la réponse IgE.

- A l'inverse l'adjuvant complet de FREUND s'il est un excellent adjuvant pour la réponse IgG, est médiocre pour l'IgE.

- Ainsi les injections répétées d'adjuvant complet de FREUND résultent dans la suppression de la réponse IgE. L'infection parasitaire chez le rat, en particulier, par un nématode : Nippostrongylus brasiliensis augmente notablement la synthèse d'IgE.

Dès 1975, ISHIZAKA et coll. ont décrit des facteurs se liant à l'IgE (IgE Binding Factors) et plus précisément des facteurs qui augmentent la réponse IgE et d'autres qui la suppriment ou du moins la diminuent. Ils ont montré que le même lymphocyte T est capable de sécréter l'un ou l'autre des facteurs selon

*l'environnement cellulaire. Cependant toute cette série de travaux semble dans ces dernières années être tombée un peu en désuétude en raison de la reconnaissance d'abord chez la souris, puis maintenant chez l'homme de deux sous-populations de lymphocytes T Helper dits TH1 et TH2. Elles produisent des cytokines différentes orientant la réponse immunitaire plutôt du côté cellulaire [TH1 avec l'IL2, l'interféron gamma (IFN**) *et le "tumor necrosis factor* 9*" (TNF*9*)] où à l'inverse humorale (TH2 avec l'IL4, l'IL5, l'IL6 et l'IL10). On s'intéresse donc beaucoup plus maintenant au rôle des cytokines dans la commutation isotypique vers l'IgE et la production privilégiée de cette classe d'immunoglobuline dans certaines circonstances.*

*Les résultats les plus tranchés portent sur le couple IL4/IFN** *: l'addition d'IL4 à des lymphocytes B stimulés par du lipopolysaccarhide (LPS) entraîne une inhibition de la production d'IgM et l'induction de la production d'IgG1 et d'IgE (chez le rat). Les doses d'IL4 optimales pour la production d'IgG1 sont différentes de celles nécessaires à la production d'IgE, cette dernière nécessitant des doses 10 à 50 fois supérieures et il faut que la cytokine soit présente pendant au moins 4 jours dans la culture. Le traitement de ces mêmes lymphocytes B stimulés par du LPS et de l'IL4 par des doses croissantes d'IFN gamma entraîne une inhibition de la production d'IgG1 et d'IgE.*

Des travaux récents de biologie moléculaire démontrent que l'IL4 est un facteur inducteur de la commutation. L'hypothèse généralement avancée pour expliquer ce phénomène est que le traitement par la cytokine aboutit à l'ouverture des régions switch µ et switch \ *au cours de la synthèse d'ADN, les rendant accessibles à la recombinase. Cette régulation étudiée d'abord in vitro a été confirmée in vivo du moins chez les souris. Dans cette espèce infectée par le nématode précédemment cité, des anticorps anti-IL4 inhibent totalement la production d'IgE ; il en est de même par l'administration de l'IFN**.

*Les IgE et certaines cytokines dont en particulier l'IL4 augmentent l'expression du Fc**RII et le relargage d'IgE- BF (c'est-à-dire la forme soluble CD23). Une première étape aboutit à la production d'un intermédiaire instable de 37 kD qui est à son tour clivé en IgE-BF stable de 25 kD. On détecte la molécule soluble dans les fluides biologiques en particulier dans le sérum. Il semble que ce soit l'intermédiaire instable de 37 kD qui soit actif comme co-facteur de la production d'IgE en potentialisant l'activité de l'Il4. Contrairement aux IgG-BF, l'IgE-BF permet une régulation rétroactive positive des IgE sur leur propre production.*

VI. ONTOGENIE DES IMMUNOGLOBULINES.

Le foetus est capable de synthétiser assez tôt certaines classes d'anticorps: on décèle des anticorps de classe IgM dès la 10ème semaine de la vie foetale et de très faible quantité d'IgG dès la 12ème. Par contre on ne retrouve pas d'anticorps de classe IgA, IgD ou IgE.

Il est bien connu que **seules les IgG maternelles franchissent le placenta** par un phénomène de transport actif. Cependant ce passage reste modeste pendant les deux premiers trimestres de la grossesse: ce n'est que vers la 20ème semaine que la perméabilité placentaire pour cette Ig augmente brusquement (cf VIII.2.2). Les enfants nés avant terme sont donc d'autant moins protégés que leur prématurité est grande.

Ces données ont une importance considérable pour le diagnostic précoce de certaines maladies: toxoplasmose par exemple. A la naissance le sérum du cordon doit renfermer un taux d'IgM nul ou très faible en tout cas, n'atteignant jamais 10 % du taux de l'adulte. Si ce chiffre est dépassé on doit envisager l'hypothèse d'une infection in utéro. En ce qui concerne la toxoplasmose, les tests sérologiques seront effectués sur les anticorps lourds (IgM) et légers (IgG) séparément. Toute positivité avec les IgM (ou les IgA) signifie une infection in utéro puisque seuls les IgG maternelles sont capables de franchir le placenta. Cette cinétique permet le diagnostic des infections foetales par le toxoplasme ou le virus de la rubéole par exemple. Des mesures thérapeutiques s'imposeront alors.

L'évolution du taux sérique des différentes classes d'Ig est la suivante: l'IgM croit la plus vite et atteint le taux de l'adulte vers l'âge de deux à trois ans. Les IgG ont une cinétique particulière: à la naissance leur taux est rigoureusement identique aux taux de l'adulte puisque ce sont les IgG maternelles qui sont présentes dans le sang du cordon par simple passage transplacentaire, alors que la propre synthèse des IgG du nouveau-né ne fait que commencer très doucement après la naissance. Suivant le catabolisme des IgG maternelles et le début très progressif de la synthèse propre des IgG de l'enfant on observe un

minimum du taux sérique d'IgG vers la période du deuxième au sixième mois, qui est une période critique pour le nourrisson, alors que le taux de l'adulte n'est atteint qu'environ à l'âge de cinq à sept ans. Quant à l'IgA elle est beaucoup plus lente dans sa croissance et le taux de l'adulte n'est atteint qu'à la puberté. Ces notions sont fondamentales pour pouvoir interpréter les dosages d'**Ig chez l'enfant**, interprétation qui doit **toujours** se faire **en comparaison avec des normes d'enfant du même âge que celui exploré.**

VII. LES DIFFERENTS NIVEAUX D'HETEROGENEITE DES IMMUNOGLOBULINES.

Nous avons vu que les Ig étaient une famille très hétérogènes. L'Ig est, comme toute protéine, antigénique et constituée de différents épitopes. Selon la nature et l'expression de ces motifs antigéniques on peut classer les différents niveaux hétérogénéité en trois types:

VII.1. L'ISOTYPIE.

Les isotypes sont constitués de motifs antigéniques que l'on rencontre chez tous les individus d'une même espèce, par conséquent inaccessible aux analyses de génétique formelle. Chez l'homme on connaît **neufs isotypes** de chaînes lourdes: µ, 11,12, 13, 14, 91, 92, 1 et 1. Tous ces isotypes sont présents dans le sérum de tous les êtres humains à des concentrations relativement analogues de l'un à l'autre. Il existe deux isotypes de chaînes légères : 1 et 1: Tous ces isotypes ont d'abord été définis sur le plan sérologique (à l'aide d'anticorps). L'isotypie est désormais parfaitement caractérisée au niveau génétique (cf IX-3).

Les déterminants isotypiques sont localisés sur les **domaines constants** des chaînes lourdes et légères. Ils sont reconnus par des antisérums produits dans des espèces animales différentes qui distinguent bien les deux chaînes légères et les cinq classes d'Ig.

Par contre les quatre sous-classes d'IgG et les deux sous-classes d'IgA partagent entre elles de trop nombreux épitopes pour que des antisérums polyclonaux puissent les différencier. Seuls des anticorps monoclonaux sont capables de reconnaître les épitopes spécifiques des sous-classes.

VII.2. L'ALLOTYPIE.

L'allotype est un motif antigénique qui ne s'observe, au sein d'une espèce, que chez un certain nombre d'individus donnés, et non chez tous. Il devient alors accessible à la génétique formelle, définissant des sous-groupes de population. On connaît trois systèmes principaux de groupes sériques portés par les Ig, héréditairement transmis selon les lois de MENDEL (mode **codominant**). Ils sont reconnus par des anticorps anti-allotypiques contenus dans certains sérums humains. Les allotypes sont les produits alternatifs (mutuellement exclusifs) de certains gènes polymorphes.

*On parle de "**spécificité allotypique**" pour les différences détectées par l'utilisation d'anticorps spécifiques. On réserve les termes de "**marqueur allotypique**" ou"**allotype**" pour décrire l'aspect génétique alors que le "**déterminant allotypique**" désigne les différences de structure au niveau moléculaire.*

A l'exception des IgA2 pour lesquelles l'allotypie fait intervenir un mécanisme de conversion génique, les allotypes des Ig sont le fruit de mutations ponctuelles intéressant un petit nombre d'acides aminés de positions constantes sur les différentes chaînes.

Certains allotypes sont difficiles à identifier, car ne correspondant qu'à une substitution portant sur un petit nombre d'acides aminés. Ceci nécessite d'utiliser des tests indirects car les anticorps spécifiques dirigés contre de tels épitopes ne sont pas toujours précipitants. De plus la caractérisation des déterminants allotypiques est souvent gênée par l'utilisation des agents réducteurs utilisés pour cliver la chaîne lourde ou légère.

VII.2.1. Le système Km (de Kappa marker, ex InV).

Le système de détection est le suivant: agglutination par un système approprié (c-a-d de spécificité anti-allotypique connue) de globules rouges Rh^+ couverts d'anticorps incomplets anti-Rhésus porteur de l'allotype correspondant, et détermination de la capacité inhibitrice du sérum de l'individu testé.

Il comporte seulement trois spécificités: Km (1), (1,2) et (3).

Les facteurs Km sont situés sur les chaînes légères d'Ig: ils sont donc communs à toutes les classes d'Ig. On ne les retrouve que sur les chaînes légères 1 *et absolument pas sur les chaînes légères* 1. *Le substratum biochimique de l'allotypie Km est connu et correspond simplement à la substitution de deux acides aminés en position 153 et 191 sur la chaîne légère* 1*:*

	153	*191*
Km(1)	*Val*	*Leu*
Km(1,2)	*Ala*	*Leu*
Km(3)	*Ala*	*Val*

On retrouve Km(1,2) chez 10 à 20% des Blancs, 30 à 60% des Noirs et 50% des Japonais. Les chiffres sont respectivement de 95 et 90% pour Km(3) chez les Blancs et les Noirs.

On n'a jamais retrouvé d'allotypes des chaînes légères 1 humaines.

Pourtant on connaît plusieurs variations minimes de la séquence d'acides aminés de ces chaînes. Trois marqueurs antigéniques différents ont été bien étudiés: Kern, Oz et Mcg, qui correspondent en réalité à des isotypes car tous les variants sont retrouvés dans le sérum de tous les individus.

Les substitutions sont les suivantes : *position*

	112	*114*	*152*	*163*	*190*
$Kern^-Oz^-$	*Ala*	*Ser*	*Ser*	*Thr*	*Arg*
$Kern^-Oz^+$	*Ala*	*Ser*	*Ser*	*Thr*	*Lys*
$Kern^+Oz^+$	*Ala*	*Ser*	*Gly*	*Thr*	*Arg*
Mcg	*Asn*	*Thr*	*Gly*	*Lys*	*Arg*

VII.2.2. Le système Gm (pour Gamma marker).

On connaît actuellement 25 facteurs pour lesquels une nomenclature numérique a été adoptée. Ces facteurs Gm, de définition sérologique, sont exclusivement situés sur les chaînes lourdes spécifiques de la classe des IgG. Plus précisément il y a une correspondance très précise entre chacune des chaînes lourdes des sous-classes des IgG et un certain nombre de marqueurs spécifiques allotypiques. C'est ainsi que le plus souvent les molécules de la sous-classe IgG1 renferment les marqueurs allotypiques Gm(1) ou Gm(4, 17), etc...

Les associations sont les suivantes :
IgG1: Gm1,-1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 17, 18, 20
IgG2: Gm8, 9, 23
IgG3: Gm5, -5, 6, 10, 11, -11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, -21, 24, 25
IgG4: Gm4a, 4b

Cette relation est tellement nette que cela a été longtemps la méthode la plus simple pour déterminer la sous-classe d'une Ig monoclonale, avant l'apparition d'anticorps monoclonaux anti-sous-classe qui permettent maintenant de répondre avec encore plus de certitude à cette question. Au même titre que les allotypes Km, les allotypes Gm correspondent à des permutations portant sur ou deux acides aminés de la région constante des chaînes lourdes 1*, le plus souvent sur le fragment Fc, parfois sur le fragment Fd. L'allèle*

Gm(1)(-1) correspond à une substitution sur deux acides aminés en position 356 et 358, alors que Gm(4) et Gm (17) correspondent à une substitution unique en position 214.

En ce qui concerne le marqueur Gm(1), appelé antérieurement Gm(a), il existe un marqueur réciproque, appelé Gm(-1); c'est-à-dire que toutes les IgG1 qui ne sont pas Gm(1) sont nécessairement Gm(-1), les marqueurs sont dits antithétiques. Ce marqueur correspond à une substitution portant sur les acides aminés 356 et 358 de la chaîne 1. Il est intéressant de remarquer que ce marqueur Gm(-1) est allèle de Gm(1) sur la chaîne 1: les acides aminés correspondants sont absents de la chaîne 1, mais sont présents sur les chaînes 2 et 3 sans qu'il donnent lieu à la création d'un motif allotypique. Ceci est l'exemple de ce qu'il est convenu d'appeler un ***iso-allotype****, car isotypique pour les IgG2 et IgG3 et allotypique pour les IgG1.*

L'ensembles des allotypes codés par un même chromosome 14 forme ce que l'on appelle un ***haplotype****. L'étude des haplotypes Gm montre que la répartition de ces marqueurs est extrêmement variable selon les populations, ce qui présente un intérêt anthropologique certain.*

Les Noirs africains sont pratiquement tous Gm(1,17) alors qu'ils ne possèdent jamais Gm(-1,4) ou Gm(1,2,17).

Le marqueur Gm(23) est présent sur les IgG2 de 14% des Japonais, d'environ 52% des Blancs, 92% des Chinois, mais est rare chez les Noirs.

Il en va de même pour les marqueurs de 3. On décrit un allotype Gm(21) et Gm(-21) qui correspond à une substitution Tyr/Phe en position 296. Présent chez les Norvégiens, les Japonais, Gm(21) est absent chez les Noirs africains. Par contre le phénotype Gm(5,10,11,14,-25) et présent chez 10% de ces derniers.

Enfin pour les IgG4 la base structurelle de la différence entre les allotypes 4a et 4b repose sur la délétion d'un acide aminé en position 309.

Des associations entre ***allotypes*** *d'Ig et susceptibilité à certaines* ***maladies*** *ont été décrites au même titre qu'entre complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) et maladies, ceci bien qu'il n'y ait pas de liaison entre ces deux systèmes géniques polymorphes (chromosome 14 pour les allotypes d'Ig, chromosome 6 pour le CMH).*

De façon encore inexpliquée, il existe des allotypes (sous-classes d'IgG) prédominants dans les réponses immunitaires selon la nature de l'antigène stimulant: on parle de ***restriction isotypique****. Les anticorps dirigés contre les polysaccharides bactériens sont principalement des IgM, IgG2 et des IgA2. Les anticorps anti-tétanique sont surtout des IgG1, alors que les anticorps anti-Rhésus D sont plutôt des IgG1 et des IgG3. Ceci explique la différence des manifestations cliniques engendrées par des déficits sélectifs en sous-classes d'IgG.*

VII.2.3. Le marqueur A2m (pour Alpha2 marker).

Seules les molécules de la sous-classe **IgA2** présentent un polymorphisme allélique avec la particularité structurale du mode de liaison des chaînes légères aux chaînes lourdes déjà décrites pour la sous-classe A2m(1). Là encore la connaissance des variants allotypiques des IgA a permis des études de génétique formelles qui ont retrouvé une prédominance de l'allotype A2m(1) chez les Caucasiens alors que l'allotype A2m(2) est majoritaire chez les Africains et les Asiatiques.

VII.2.4. L'exclusion allélique ou haploïdie fonctionnelle.

Pour un allotype donné, Km par exemple, l'individu hétérozygote hérite de chacun de ses deux parents d'un allèle. Bien que le lymphocyte B, comme toute cellule, soit diploïde, et possède 2n chromosomes, et donc deux allèles pour chaque locus polymorphique comme Km, les molécules d'Ig produites par un lymphocyte donné ne seront porteuses que d'un seul des allotypes, et jamais des deux à la fois. En d'autre terme, bien que le lymphocyte B soit diploïde, il se comporte comme si il était haploïde. Ce phénomène d'**haploïdie fonctionnelle**, encore appelé **exclusion allélique**, est rare en biologie moléculaire. Les progrès accomplis dans la connaissance des gènes des Ig ont permis de comprendre le mécanisme de survenue de ce phénomène. Nous y reviendrons (cf IX.3.3.6).

VII.3. L'IDIOTYPIE.

Les idiotopes sont des épitopes portés par le **fragment Fv (V_H-V_L)** des Ig. Ils peuvent être ou non associés au paratope. L'ensemble des idiotopes d'une molécule d'Ig forme son **idiotype**.

VII.3.1. Découverte des idiotypes.

C'est KUNKEL qui le premier fit la preuve que les protéines de myélome possédaient des épitopes propres, correspondant aux domaines variables: des anticorps préparés contre une Ig monoclonale, extensivement absorbés contre des Ig polyclonales normales et de nombreuses autres Ig monoclonales de tout isotype et de tout allotype continuaient à réagir avec l'immunogène. Cette expérience faisait la preuve qu'une immunoglobuline donnée (monoclonale) possède des déterminants propres (idiotypes) indépendants des isotypes et allotypes.

*La démonstration de l'existence des idiotypes est l'oeuvre du Français Jacques OUDIN, en 1963, à l'Institut Pasteur. Dans son expérience princeps il avait immunisé un lapin A avec l'injection d'une suspension de Salmonelles. Au bout de quelques jours le lapin A produit des anticorps spécifiques. On précipite cet anti-sérum avec une suspension de Salmonelles d'origine: les anticorps purifiés sont injectés à un deuxième lapin B, rigoureusement identique au lapin A pour sa formule allotypique afin d'éviter une immunisation anti-allotypique. On attend quelques jours et on prélève à nouveau le sérum de ce deuxième lapin. On s'aperçoit alors qu'il ne réagit absolument pas avec le sérum du lapin A prélevé avant toute immunisation, et gardé à titre de contrôle, mais qu'il réagit très fortement avec le sérum du lapin A prélevé après immunisation par les Salmonelles. On définit ainsi un système idiotypique pour lequel l'immun sérum immunisant du lapin A contient des idiotypes ou molécules d'anticorps caractérisées par leur **spécificité idiotypique** spécifiquement reconnue par le sérum du lapin B dit **anti-idiotypique**. Par contre si on avait immunisé d'autres lapins, C, D, etc..., de la même façon avec des Salmonelles, l'anti-sérum du lapin B n'aurait pas réagit avec les sérums de ces lapins. C'est-à-dire qu'il s'agit d'une réaction homologue spécifique du premier système.*

La réaction de précipitation décrite par OUDIN est une réaction dite "homologue". Une précipitation entre le sérum anti-idiotypique B et un anti-sérum anti-Salmonelle obtenu chez un lapin autre que A serait appelé "hétérologue". De telles réactions hétérologues ont été décrites dans d'autres systèmes idiotypiques, au cours de réponses du lapin dirigées contre les antigènes polysaccharidiques du pneumocoque par exemple. Les expérience de KUNKEL constituent un système hétérologue que l'on peut comparer à celles d'OUDIN:

	idotype (Id)	*réponse anti-Id*
OUDIN	*anticorps induits (hétérogène)*	*homologue*
KUNKEL	*protéines de myélome (homogène)*	*hétérologue*

Nous avons ainsi affaire à deux approches différentes qu'il faut replacer dans leur contexte. OUDIN postulait que l'idiotypie n'apparaissait qu'avec l'immunisation, autrement dit que les idiotypes liés à la fonction anticorps sont soit absents, soit présents en trop faible quantité pour être détectables dans le sérum pré-immun. KUNKEL travaillait lui sur des Ig monoclonales dont il ignorait la nature anticorps. Mais il disposait d'une grande quantité d'immunogène homogène contre lequel il put préparer un anti-sérum anti-idiotypique moins hétérogène. L'étape d'absorption contre des Ig polyclonales l'exposait cependant au risque d'absorption par des idiotypes publics partagés avec un faible contingent d'Ig polyclonales.

Ultérieurement cette notion d'idiotypie et d'anticorps anti-idiotypiques a été étendue à bien d'autres systèmes d'anticorps, mais aussi à d'autres espèces animales, notamment chez la souris: chez les souris de souches pures on retrouve de nombreuses réactions hétérologues qui permettent de définir des ***idiotypes publics*** *par opposition aux* ***idiotypes privés*** *tel qu'on les observait dans l'expérience d'OUDIN.*

Les idiotypes publics correspondent à des idiotopes portés par des séquences VL, VH ou D germinales, non directement liées au paratope et communes à plusieurs espèces d'anticorps trouvés chez différents individus.

Les idiotypes privés sont les conséquences des mutations somatiques (cf infra, IX.3.3.5) propres à chaque clone de lymphocytes survenant dans les centres germinatifs.

A la différence des allotypes qui sont détectés sur les immunoglobulines sans immunisation préalable et ne sont donc pas liés à leur fonction anticorps, les spécificités **idiotypiques** qui distinguent les diverses immunoglobulines d'un même individu ne se détectent qu'à la suite de l'injection d'un antigène. La détection de l'idiotypie dépend donc du degré d'immunisation de l'individu. Il existe donc une très grande variété de spécificités idiotypiques alors que le nombre de spécificités allotypiques est au sein d'une espèce en général petit.

VII.3.2. Localisation des idiotypes.

Comme on pouvait le présupposer, il a été rapidement montré que les spécificités idiotypiques étaient situées sur le fragment Fab des Ig, et plus particulièrement sur le **fragment Fv** (régions VH + VL). La spécificité idiotypique est très généralement partagée entre les chaînes lourdes et légères.

Elle peut être totalement inhibée par l'haptène auquel correspond spécifiquement l'anticorps, auquel cas on admet que l'idiotype est pratiquement confondu avec le site anticorps; d'autres fois l'haptène n'inhibe pas ou seulement partiellement et l'on en déduit que l'idiotype est lié au site anticorps mais à une courte distance en dehors du site anticorps.

VII.3.3. Exemples d'idiotypes publics.

VII.3.3.1. Réponse anti-phosphorylcholine

Les souris BALB/c immunisées par le polysaccharide du pneumocoque présentent très souvent un idiotype public appelé ***T15*** *qui a été étudié de manière très approfondie. D'autre part plusieurs Ig monoclonales humaines de myélome ont une activité anticorps anti-phosphoryl-choline et présentent des similitudes très importantes avec l'idiotype T15, suggérant que les mêmes résidus sont sélectionnés dans des espèces différentes pour former le site de liaison à la phosphorylcholine.*

VII.3.3.2. Réponse anti-9(113) dextrane

*Un autre système a été particulièrement étudié aussi chez la souris BALB/c: celui de la réponse à un polysaccharide, l'*9*(1*1*3) dextrane. Cet immunogène induit dans cette lignée la production d'anticorps d'hétérogénéité restreinte, puisqu'ils possèdent tous des chaînes légères uniquement* 1.

Plusieurs protéines de plasmocytomes murins ont une activité anti-dextrane. Trois d'entre elles ont été particulièrement étudiées: J558, M104 et UPC102. Des anti-sérums anti-idiotypiques ont été produits contre elles, ce qui a permis de définir un idotype public retrouvé sur les trois protéines, et des idiotypes privés, spécifiques de chacune d'entre elles. L'obtention, par la technique des hybridomes, d'anticorps anti-idiotypiques monoclonaux a permis aux groupe de DAVIE *et* HOOD *de localiser et d'identifier les acides aminés impliqués dans l'expression de ces différents idiotopes.*

VII.3.3.3. Facteurs rhumatoïdes

On a aussi rapporté des idiotypes publics portés par les facteurs rhumatoïdes, c'est-à-dire des auto-anticorps de classe IgM à activité anti-IgG chez l'homme; ceci n'empêche pas chaque facteur rhumatoïde individuel d'être porteur éventuellement d'un idiotype privé.

VII.3.4. Régulation idiotypique et théorie du réseau.

En 1974 Niels JERNE a émis une théorie très originale, quelque peu abstraite au début, qui s'est trouvée expérimentalement confirmée depuis: selon cette théorie du **réseau idiotypique**, chaque molécule d'anticorps (Ab1, pour antibody one) porte des déterminants idiotypiques qui lui sont propres et qui induisent la production d'un deuxième anticorps (Ab2) qui les reconnaît spécifiquement. A son tour la molécule Ab2 porteuse d'idiotype est reconnue par un troisième anticorps dit Ab3 qui à son tour est reconnu par un quatrième, etc... On a donc : Ab1 (p1 = anti-antigène, id1), Ab2 (p2 = anti-id1, id2), Ab3 (p3 = anti-id2, id3), etc...D'autre part, il est connu que l'injection d'anticorps anti-idiotype à certaines doses supprime la production de l'anticorps correspondant. A l'équilibre, l'anticorps Ab2 supprime donc la production de l'anticorps Ab1. L'introduction de l'antigène 1 (Ag1) rompt cet équilibre et stimule la production de l'anticorps Ab1. A son tour celui-ci stimule la production de l'anticorps Ab2 qui tend à restaurer l'équilibre rompu pour un moment. Il faut noter que certains anticorps anti-idiotypiques produits au sein de ce réseau donnent lieu à des réactions croisées avec l'antigène et quelque fois en partagent même la fonction comme dans le cas de l'insuline par exemple. Ils jouent donc le rôle de **l'image interne** de l'antigène et ce concept sera donc mis à profit pour l'obtention de vaccin lorsqu'il est impossible pour diverses raisons d'obtenir un antigène vaccinant naturel ou recombinant.

*On distingue donc deux types d'anticorps Ab2. En effet, l'anticorps Ab1 porte un idiotope i1 sur son paratope p1 anti-antigène. Certains des anticorps Ab2 (**Ab2**9) n'empêchent pas la liaison de l'anticorps Ab1 à son antigène, car reconnaissant des épitopes séquentiels (portés sur* V_H *ou* V_L*) ou conformationnels (association de* V_H *et* V_L*) à distance du paratope. Les autres (**Ab2**9) inhibent l'interaction anticorps Ab1-antigène (paratope p1-épitope) en se liant à des séquences participant directement au paratope .*

*Les anticorps Ab2*9 *se comportent comme l'**image interne** de l'antigène par leur capacité à se lier au paratope d'Ab1. Ils pourront donc être utilisés à la place de l'antigène pour la réalisation de vaccins par des anticorps anti-idiotypiques quand la disponibilité de l'antigène n'est pas possible, ou pour toute autre manipulation du réseau idiotypique.*

*L'immunisation avec des anticorps Ab2 induit trois types d'anticorps **Ab3**:*

- certains sont identiques à Ab1 (p3 1 *p1, i3* 1 *i1), car l'anticorps immunisant se comporte comme l'image interne de l'antigène (Ab2*9*)*

- d'autres partagent des idiotopes avec Ab1, mais reconnaissent un antigène différent (p3 1 *p1, i3* 1 *i1). Un même idiotope peut donc se retrouver sur des molécules d'anticorps de spécificité différente. On parle d'idiotope **récurrent,** qui ont le plus souvent un rôle régulateur.*

- enfin d'autres reconnaissent le même antigène mais portent des idiotopes différents (p3 1 *p1, i3* 1 *i1). L'apparition de ces nouveaux idiotopes peut s'expliquer par la maturation d'affinité consécutive aux hypermutations somatiques.*

La description schématique qui vient d'être faite du réseau idiotypique de JERNE ne s'applique en réalité pas seulement aux anticorps en solution, mais aussi aux Ig de membrane des lymphocytes B, en amont de la production des premiers qui sont les produits d'excrétion des cellules: il est évident que les Ig de surface des lymphocytes B sont porteurs d'idiotypes propres à chaque clone de lymphocytes B, transmis à l'anticorps qui sera sécrété par ce clone et reconnu par les Ig de surface d'un autre clone porteur de la spécificité anti-idiotypique correspondant. On peut donc décrire un réseau idiotypique cellulaire, non seulement au niveau des lymphocytes B, mais aussi des lymphocytes T.

*L'existence du réseau idiotypique peut en partie expliquer l'**acquisition du répertoire B** chez le foetus au contact des IgG maternelles. Un anticorps Ab29 maternel peut remplacer un antigène: son effet, stimulant ou répressif, sur la production de l'anticorps Ab1 dépend de l'isotype de l'anticorps Ab2 et du stade de différenciation du lymphocyte B. Ainsi, "comme dans la caverne de Platon, l'organisme humain en développement découvre le monde extérieur à travers l'ombre projetée (l'image interne, Ab2 maternels) de la réalité moléculaire (antigènes)" (JP RÉVILLARD).*

Par le biais de l'image interne, des anticorps Ab2 dirigés contre un anticorps Ab1 anti-hormone peuvent se lier au récepteur de l'hormone et avoir un effet agoniste ou antagoniste.

L'existence dans les préparations d'Ig humaines pour perfusion intra-veineuse d'anticorps Ab2 dirigés contre des auto-anticorps pathogènes (tels que les anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine dans la myasthénie, ou les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles dans les vascularites nécrosantes) autorise l'utilisation de ces préparations d'Ig à des fins thérapeutiques pour manipulation du réseau idiotypique.

VII.4. CONCLUSION.

On peut donc distinguer les antisérums polyclonaux, obtenus chez l'animal après immunisation par une molécule antigénique entière, des antisérums monoclonaux, spécifiques d'un épitope unique, qu'ils soient artificiels (hybridomes) ou pathologiques (KAHLER, WALDENSTRÖM).

Les **antisérums polyclonaux** comportent :

- des immunoglobulines de classes et de sous-classes différentes
- plusieurs allotypes de chaînes lourdes et légères kappa
- des chaînes légères kappa et lamda
- différents paratopes liant les différents épitopes de la molécule d'antigène
- d'affinités différentes

Les **antisérums monoclonaux**, à l'inverse, sont caractérisés par :

- une seule classe, voire une seule sous-classe d'immunoglobuline
- un seul isotype de chaîne légère, soit kappa, soit lamda
- un seul allotype de chaîne lourde et de chaîne légère, si il existe un polymorphisme allélique
- une spécificité anticorps unique, se liant à un seul épitope
- d'affinité unique

VIII. RELATIONS ENTRE STRUCTURE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE.

VIII.1. PROPRIÉTÉS PORTÉES PAR LE FRAGMENT FAB DES IG: LE SITE ANTICORPS.

Les expériences de clivage enzymatique faites sur l'IgG montrent bien que le site anticorps est localisé du côté amino-terminal des deux chaînes. On a déjà insisté sur le caractère **symétrique** de la molécule: **les deux sites anticorps (paratopes) sont identiques**; il n'existe jamais d'Ig hybride ayant un Fab doué d'une activité anticorps et l'autre d'une activité différente. Ceci s'explique par la synthèse cellulaire des Ig (voir plus loin). Il est clairement établi que **les deux chaînes légères et lourdes participent activement à la constitution du site anticorps.** L'ensemble des sites anticorps dont peut disposer un individu, constitue ce qui l'est convenu d'appeler son **répertoire B**, lui permettant de reconnaître les déterminants antigéniques correspondants.

Les expériences classiques de VALENTINE et GREEN montrent au microscope électronique des complexes immuns formés par des molécules d'IgG bivalentes réunies par un haptène de faible poids moléculaire lui-même bivalent. Les complexes immuns apparaissent sous la forme de figures géométriques simples: triangles, losanges, pentagones. Les expériences plus récentes de marquage d'affinité, et depuis peu de mutagénèse dirigée, confirme que les acides aminés entrant dans la composition du site anticorps appartiennent à la fois aux chaînes H et L et que les résidus les plus intéressés, comme on pouvait s'en douter, aux régions hypervariables.

Des expériences classiques, conduites par KABAT qui utilisait l'inhibition de précipitation, montraient déjà que le site anticorps ne représentait qu'une très faible portion de la molécule entière d'Ig: moins de 1 %. Les études plus récentes (cristallograhie au rayons X) de la structure tridimensionnelle du site actif pratiquées sur des fragments Fab ou $F(ab')_2$ d'Ig monoclonale douée d'activité anticorps confirment et précisent les données antérieures. Il apparaît que le site anticorps est plus une rainure superficielle qu'une crevasse profonde. La totalité des six régions hypervariables (3 de la chaîne H et 3 de la chaîne L) n'est pas toujours requise pour la constitution du site anticorps.

L'obtention de cristaux de complexes F(ab)anti-lysozyme-lysozyme ont permis à POLJAK de confirmer que les deux régions VH et VL participaient à la formation du paratope. Une vingtaine d'acides aminés sont impliqués dans la reconnaissance de l'épitope, et une moyenne d'un atome par acide aminé contribue à la formation d'une liaison avec l'atome de l'antigène.

La taille du paratope (34x8x12 Å) lui permet de se combiner à un épitope sucré de **5 à 6 oses**, ou protidique de **10 à 15 acides aminés**.

La liaison antigène-anticorps est une liaison **non-covalente**, détruite par les fortes concentration en sel, les pH extrêmes et les détergents. Elle fait intervenir un ensemble de forces à court rayon d'action: **forces électrostatiques** entre groupements de charges opposées, **liaisons hydrogènes** avec partage d'un ion H+ entre groupements de charges opposées, **forces de van der Waals** par fluctuation de nuages électroniques autour de deux atomes voisins, **liaisons hydrophobes** par exclusion des molécules d'eau entre deux groupements apolaires. L'intensité de liaison, quantifiée par l'énergie de liaison, est fonction de la surface de contact entre le site anticorps (**paratope**) et le déterminant antigénique (**épitope**) qui fait intervenir des phénomènes de complémentarité spatiale.

La liaison antigène-anticorps est **réversible.** Au niveau moléculaire (paratope-épitope) l'affinité est caractérisée par une constante d'association K qui est :

$$Ag + Ac \underset{k-1}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} Ag\text{-}Ac$$

$$K = \frac{k1}{k-1}$$

Elle est exprimée en L/M et varie de 10^4 (faible affinité) à 10^{11} (très forte affinité).

*Le changement d'un seul acide aminé au sein du paratope peut considérablement affecté l'**affinité**; Ce mécanisme est mis à profit par le système immunitaire pour augmenter l'affinité des anticorps après une stimulation antigénique (maturation d'affinité par hypermutations somatique, cf cours sur le lymphocyte B) et par les micro-organismes pour échapper à la réponse immunitaire par mutation de l'épitope.*

*Lorsque l'on s'intéresse aux molécules entières d'Ig d'un sérum polyclonal, on parle d'**avidité**, eu égard aux nombreux couples épitopes-paratopes différents mis en jeu, susceptibles de créer un effet synergique sur la liaison à l'antigène.*

VIII.2. PROPRIÉTÉS PORTÉES PAR LE FRAGMENT FC.

Le fragment Fc est **dénué de toute activité anticorps** mais est le support de plusieurs activités biologiques très importantes qui confèrent à l'Ig son caractère

bifonctionnelle: liaison de l'antigène puis propriétés effectrices. A la différence des chaînes lourdes, on ne connaît pas de fonctions biologiques associées au fragment C_L.

Ces propriétés résultent de l'existence de sites de liaison spécifiques sur les domaines constants pour différents types de molécules, solubles (complément) ou membranaires (RFc). Ainsi le site reconnu par la protéine A du Staphylocoque doré est toujours accessible sur les domaines C11 et C13.

Certaines de ces propriétés apparaissent sur les Ig natives: d'autres ne s'extériorisent que lorsque les extrémités Fab de la molécule ont rencontré les déterminants antigéniques spécifiques qui leur correspondent.

VIII.2.1. Catabolisme.

La vitesse de catabolisme, c'est-à-dire ce qui régit en partie la durée de vie des diverses classes d'Ig dans l'organisme est une fonction réglée par le fragment Fc, et plus particulièrement le C_H2. En effet cette durée de vie est approximativement la même pour le fragment Fc que pour l'Ig native, alors que le fragment Fab isolé est au contraire très rapidement catabolisé.

On constate que les IgG (à l'exception de l'IgG3) ont une demi-vie d'environ trois semaines, chiffre à prendre en considération lors des prescription d'Ig intra-veineuses à des fins thérapeutiques substitutives dans les grandes hypogammaglobulinémies.

L'exception des IgG3 s'explique par la longueur de la région charnière de cette sous-classe. Les quatre autres classes d'Ig ont une demi-vie beaucoup plus brève ne dépassant pas une semaine.

La connaissance de cette durée de vie est indispensable pour rythmer les perfusions d'immunoglobulines intra-veineuses, qui sera de l'ordre d'une injection mensuelle, afin d'assurer un taux protecteur estimé à 5 g/L.

VIII.2.2. Traversée du placenta.

Seules les IgG traversent le placenta dans l'espèce humaine, assurant le transfert de l'immunité humorale de la mère à l'enfant (immunité passive) : le sérum du nouveau-né renferme un taux d'IgG au moins égal à celui de sa mère.

L'étude des marqueurs allotypiques prouvent que ces IgG proviennent entièrement de la circulation maternelle. Le transfert est maximum en fin de grossesse (à partir du 7ème mois), ce qui explique le déficit en IgG des nouveau-nés prématurés.

*Le placenta n'agit pas comme un simple filtre mécanique arrêtant les grosses molécules telles que les IgM. En effet l'IgA et l'IgD sérique maternelle, qui ont un poids moléculaire de sensiblement même ordre de grandeur que l'IgG, ne sont pas retrouvées dans la circulation foetale. Il s'agit donc d'un phénomène **actif** lié au fragment Fc des IgG. Il existe au niveau du placenta des récepteurs particuliers pour le Fc des IgG qui aident au franchissement de cette barrière. On conçoit toute l'importance de ce passage pour la défense du nouveau-né. Dans certaines espèces animales, il n'en est pas ainsi et les premiers anticorps sont apportés dans les premiers jours de la naissance par le colostrum maternel, lequel est capable , chez le veau nouveau-né de franchir la barrière intestinale.*

VIII.2.3. Traversée des muqueuses.

Cette propriété concerne principalement les **IgA** dans leur forme sécrétoire: nous avons vu que c'est là encore un mécanisme actif qui transfère le dimère d'IgA du chorion muqueux sous-jacent vers la lumière (intestinale, pulmonaire, etc...) où elle est l'isotype majeur de protection. Ce transport repose sur l'existence d'un récepteur spécifique qui

reconnaît l'extrémité Fc des Ig polymères, qui devient après transcytose du complexe IgA/récepteur et protéolyse partielle au pôle apicel, la pièce secrétoire..

VIII.2.4. Fixation du complément.

Seules les **IgM** et les **IgG (sauf les IgG4)** sont capables de fixer le premier composant C1q de la voie classique du complément lorsque les sites anticorps ont été activés par liaison à leur antigène spécifique.

La hiérarchie d'activation du C1q par les sous-classes d'IgG est la suivante: IgG3 > IgG1 > IgG2. La différence de structure des régions charnière explique cette hiérarchie, par la flexibilité différente et l'accessibilité différente des acides aminés contact du C1q.

Encore faut-il pour déclencher l'activation que au moins deux domaines CH2 d'IgG soient proches l'un de l'autre à une distance correspondant aux dimensions de la molécule C1q. On a calculé qu'il y a une chance sur mille pour qu'un doublet d'IgG remplisse ces conditions et soit efficace. Par contre, l'IgM, de par sa structure pentamérique, est dans la bonne configuration et il suffit théoriquement d'une seule molécule ayant rencontré les déterminants antigéniques correspondants pour que le C1q se trouve placer juste entre les Fc du polymère.

VIII.2.5. Fixation aux récepteurs des fragments Fc (FcR).

Ces récepteurs, exprimés variablement à la surface de différents types cellulaires, appartiennent tous, à l'exception du récepteur de faible affinité des IgE (CD23), à la superfamille des immunoglobulines. Pour les IgG, ces FcR sont même capables de distinguer les sous-classes qu'ils fixent avec plus ou moins d'affinité : les IgG2 ne sont fixées que par le Fc1RIIA

*Classiquement ces récepteurs étaient mis en évidence par des méthodes d'**immunocytoadhérence** : on incubait les monocytes ou les lymphocytes avec des suspensions de globules rouges sensibilisés par des anticorps d'une classe donnée. On observait la formation de rosettes, c'est-à-dire de plusieurs hématies entourant la cellule porteuse du récepteur pour le Fc. Désormais la disponibilité d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces récepteurs permet une analyse par immunofluorescence à l'aide d'un appareil appelé **cytomètre en flux**. Les monocytes/macrophages ont ainsi tendance à fixer préférentiellement les sous-classes IgG1 et IgG3 alors que les polynucléaires neutrophiles fixent les quatre sous-classes d'IgG.*

*La fixation à un récepteur spécifique du fragment Fc des Ig d'un complexe antigène-anticorps est l'étape préliminaire indispensable à l'élimination de cet antigène soit par phagocytose, soit par destruction de la cellule cible, qui exprime cet antigène à sa surface, par une cellule tueuse selon le processus de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ou **ADCC** pour "antibody dependent cellular cytotoxicity").*

On distingue des récepteurs de **forte affinité**, appelés de type I (Fc1RI, FC1RI) et des récepteurs de **faible affinité**.

Les premiers sont capables de fixer des monomères d'immunoglobulines sur les cellules qui les expriment et sont ainsi en attente de rencontrer leur antigène spécifique. Cette liaison, si tant est que l'antigène soit multivalent et puisse ainsi former un pont entre au moins deux récepteurs, entraînera l'activation de la cellule.

Les récepteurs de faible affinité, de type II ou de type III, ne peuvent fixer que des immunoglobulines complexées à leur antigène, ou agrégées.

La structure des FcR fait intervenir deux à trois chaînes :

- une **chaîne** 9, comprenant 2 à 5 domaines Ig-like dans sa portion extra-cellulaire. C'est la chaîne de liaison à l'immunoglobuline

- une **chaîne** 9, comportant 4 domaines transmembranaires, uniquement retrouvée dans le Fc1RI et le Fc1RIIIA

- deux **chaînes** 1, liées de manière covalente par un pont disulfure, qui permettent la transduction du signal, et sont équivalentes à la chaîne 1 du CD3

Il existe trois classes de récepteurs pour le Fc des IgG ou Fc1R: **Fc1RI (CD64**), **Fc1RII (CD32**) et **Fc1RIII (CD16)** qui ont tous leurs gènes sur le chromosome 1 et appartiennent à la superfamille des Ig.

CD64 est d'expression constitutionnelle sur les monocytes/macrophages et inductible sur les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. C'est un récepteur de forte affinité qui lie les IgG monomères. CD32, récepteur de faible affinité ne liant que les agrégats d'IgG, est exprimé de façon constitutionnelle sur de nombreuses cellules (monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, cellules de Langerhans, plaquettes, lymphocytes B). CD16, lui aussi récepteur de faible affinité, est exprimé de façon constitutionnelle par les monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles et certaines sous-populations de lymphocytes T. Il est inductible sur les polynucléaires éosinophiles.

Les **mastocytes** tissulaires ainsi que les **polynucléaires basophiles** ont la propriété très particulière de fixer de manière très avide le **Fc des IgE**, par le domaine C13 . Cette fixation fait intervenir un récepteur (**Fc1RI**) (cf supra V.5.4).

*La cellule est ainsi recouverte d'IgE libres qui servent de récepteurs pour l'allergène correspondant et, lorsque celui-ci est reconnu comme tel, il se produit un signal au niveau de la cellule qui relargue l'ensemble du contenu de ces granules contenant des amines fortement vaso-actives. Ceci explique les phénomènes d'**allergie** encore appelée **hypersensibilité immédiate**. Il faut souligner que ce type d'anticorps de classe IgE ne se fixe que sur des cellules de la même espèce (anticorps dits **homocytotropes**) à la différence d'autres anticorps cytophiles comme les IgG capables de se fixer sur des cellules d'autres espèces animales.*

Un deuxième récepteur de faible affinité existe pour les IgE (**Fc1RII** ou **CD23**), qui est exprimé à la surface des lymphocytes, des polynucléaires éosinophiles, des monocytes et des macrophages (cf supra V.5.4 et cours *lymphocyte B*). C'est le seul RFc qui n'appartienne pas à la superfamille des Ig.

Selon le type de RFc, et en fonction de la cellule qui l'exprime, la liaison des Ig aux RFc peut entraîner :

- la phagocytose après opsonisation
- la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante (ADCC)
- l'anaphylaxie
- la régulation de la production d'anticorps

VIII - 2 - 6 - Fixation du Fc à d'autres composants

De nombreux micro-organismes possèdent des protéines dans leurs membranes ou leurs parois capables de fixer les Ig par leur fragment Fc. Ceci est un mécanisme de protection contre une attaque de ces dernières par le fragment anticorps.

*Citons la **protéine A** du Staphylocoque qui fixe les IgG1, 2 et 4, la **protéine G** du Streptocoque capable elle de fixer les quatre sous-classes d'IgG, et enfin une lectine, la **jacaline**, issue d'un fruit tropical (le jacquier), capable de fixer les IgA1 et les IgD par liaison au galactose spécifiquement présent dans les chaînes sucrées de ces deux seules immunoglobulines.*

Ces propriétés sont utilisées au laboratoire pour purifier ces différents isotypes.

IX. GENES DES IMMUNOGLOBULINES.

IX.1. Aspects cytologiques.

La synthèse des Ig est assurée par les lymphocytes B et leur descendance plasmocytaire.

Dans les lymphocytes B jeunes dits pré-B, on trouve en immunofluorescence de l'IgM exclusivement dans le cytoplasme, ou plus précisément des chaînes lourdes μ seulement, puis au fur et à mesure de la maturation cellulaire les Ig s'expriment à la surface de la cellule (IgS) fichées dans la membrane, servant de récepteurs spécifiques d'antigènes. Certains lymphocytes B à un moment donné de leur existence peuvent posséder simultanément des IgS de plusieurs classes, c'est-à-dire plusieurs isotypes : IgM, IgD, quelquefois IgG. Il s'agit de cellules en train d'opérer la commutation, le "Switch".

Mais il est important de noter que dans ces cas la **spécificité idiotypique**, portée par les parties variables des chaînes d'Ig, reste rigoureusement **la même** pour les diverses IgS d'un lymphocyte donné.

Par contre un clone de plasmocytes, provenant de la division et de la différenciation d'un lymphocyte B activé, ne porte plus d'IgS mais sécrète activement un grand nombre de molécules d'Ig (environ 2 000 par seconde), pendant sa durée de vie relativement courte. Les Ig produites par ce clone sont toutes de même isotype, même allotype, même idiotype.

IX.2. Aspects biochimiques.

La synthèse des Ig obéit aux règles générales de la synthèse des protéines ; on a pu isoler des ARN messagers de deux tailles différentes : les uns codant pour les chaînes lourdes traduits en 60 secondes sur de volumineux polysomes ; les autres plus courts codant pour les chaînes légères achevés en 30 secondes sur des polysomes plus petits. Ces polysomes bordent les sacs ergastoplasmiques ; les chaînes d'Ig s'y déversent, s'y assemblent, y cheminent et transitent nécessairement par le corps de Golgi où les glycosyl-transférases attachent en des points et selon une séquence bien déterminée les groupements prosthétiques glucidiques. Les Ig achevées quittent le plasmocyte par un processus de pinocytose inverse environ 20 minutes après leur naissance. En ce qui concerne les Ig polymères (IgM, IgA sécrétoire) l'assemblage des sous-unités se fait essentiellement à la phase finale, juste au moment du franchissement de la membrane plasmique. La chaîne J, elle-même synthétisée par le plasmocyte, joue très probablement un rôle dans ce processus de polymérisation.

IX.3. Aspects génétiques.

Le nombre de structures différentes que le système immunitaire est appelé à reconnaître est extrêmement élevé. Pour la réponse humorale on estime que la taille moyenne d'un clone est d'environ 10^3 cellules, ce qui fait que les 10^{11} lymphocytes B présents à un instant donné sont capables de produire 10^8 molécules d'anticorps différentes. Le problème qui se pose est de savoir comment le système immunitaire peut générer une telle diversité, puisque le nombre total de gènes chez l'homme se situe aux alentours de $5.\ 10^4$ pour l'ensemble du génome.

IX.3.1. Une chaîne polypeptidique : plusieurs gènes

*L'explication de l'obtention du répertoire B, c'est-à-dire de la création de la diversité des anticorps est longtemps restée un sujet de débat violent entre les immunologistes. Le dogme de biologie moléculaire qui postulait qu'à un gène correspondait une chaîne glycoprotéique conduisait à deux théories qui longtemps restèrent violemment opposée : une **théorie germinale** pour laquelle les 10^{11} anticorps potentiels étaient codés dans le génome. Cette théorie avait l'inconvénient d'utiliser la quasi-totalité de l'ADN disponible uniquement pour l'information du répertoire B ne laissant quasiment plus aucune place pour l'information codant pour les autres tissus. La deuxième théorie, dite des **mutations somatiques**, ne présupposait qu'un tout petit nombre de gènes, qui subissaient, au cours de la différenciation du lymphocyte B, un grand nombre de mutations.*

L'étude des séquences des chaînes polypeptidiques lourdes et légères d'Ig a conduit, comme on l'a vu, à la reconnaissance de leur division en parties **variables** et **constantes** ; il est donc rapidement devenu évident que de telles chaînes ne pouvaient être commandées par un seul gène comme le voudrait la biologie moléculaire classique.

On a pu montrer qu'il n'y avait bien qu'un seul ARN messager par chaîne polypeptidique, bien suffisamment (et même trop) long pour traduire la totalité de la chaîne. On a donc été conduit à postuler que la jonction V-C se produisait au niveau de l'ADN.

IX.3.2. Les 3 groupes de translocation

Les gènes des différentes chaînes ont été localisés : sur le **chromosome 14q32** pour les **chaînes lourdes**, sur le **chromosome 2p12** pour les **chaînes** 1 et sur le **chromosome 22q11** pour les **chaînes** 1.

*L'étude comparative attentive, aidée d'ordinateurs, de nombreuses séquences disponibles de chaînes lourdes et légères révèle que les parties variables V*1 *sont nécessairement raccrochées à des parties constantes C*1 *; de même il existe un système indépendant du précédent pour V*1 *et C*1*. Par contre, les parties V_H peuvent se trouver associées à n'importe quelle partie constante de chaînes lourdes, c'est-à-dire C*1 *, C*9*, C*1*, C*1*, C*1 *(sans mentionner en réalité les sous-classes correspondantes).*

Il est donc particulièrement remarquable que les régions VH sont communes et que l'individualisation des classes provient exclusivement de la structure de la région constante de leur chaîne lourde.

IX.3.3. Les gènes d'Ig

A partir de 1975 les spécialistes de la biologie moléculaire, TONEGAWA en tête, se sont attachés à décrire l'organisation des gènes d'immunoglobulines d'abord des souris puis de l'homme. Les connaissances acquises très complètes à ce jour seront résumées de manière simplifiée ci-dessous en se cantonnant aux gènes humains. Ils ont commencé par isoler des ARN messagers de cellules de myélomes. Ils ont ensuite fait des hybridations ADN-ARN pour estimer le nombre de gènes présents dans l'ADN génomique et codant pour les chaînes légères et lourdes. Grâce à des sondes V et C ils ont ensuite localisé les gènes sur les chromosomes correspondants.

On est ainsi arrivé à la conclusion que la diversité des anticorps reposait sur des mécanismes de **recombinaisons génétiques** entre fragments géniques. Le postulat n'est plus la correspondance entre une chaîne protéique et un gène, mais entre un domaine d'Ig et un gène. Chaque domaine (VH, VL, C1, C1, C1, etc...) est codé par un fragment génique. Ces fragments sont éloignés et non transcrits dans l'ADN génomique. Uniquement dans le lymphocyte B qui se différencie ces gènes vont être rapprochés (réarrangés) pour être transcrits et formés un ARN messager primaire.

Il a été montré que l'obtention d'une région variable complète nécessitait le rapprochement de **deux** fragments géniques pour les chaînes **légères** et de **trois** pour les chaînes **lourdes**. En effet, pour les deux types de chaînes, on décrit des **gènes V** codant pour la quasi totalité N-terminale de la région V et des **gènes J** (pour jonction) pour la dizaine d'acides aminés C-terminaux de liaison avec le premier domaine constant. Uniquement pour les chaînes lourdes existe un troisième type de fragment génique, des **gènes D** (pour diversité) codant pour quelques acides aminés, localisés dans le CDR3, entre les produits des gènes V et des gènes J.

IX.3.3.1 Gènes des chaînes légères

Le **locus IgK** s'étend sur 1820 kb et comprend **un seul gène C**1 (sur le chromosome 2) et 76 **gènes V**1 dont **34** fonctionnels appartenant à 5 familles de V1.

*V*1 *et C*1 *sont fort éloignés les uns des autres dans l'ADN génomique mais se retrouvent très rapprochés dans l'ADN du lymphocytes B puis du plasmocyte qui sécrétera la chaînes légère* 1 *considérée. C'est donc ce phénomène très particulier de rapprochement de gènes "éclatés" qui est à l'origine de la différenciation de la lignée lymphocytaire B. Ce processus semble d'ailleurs assez général pour diverses protéines et valable également pour les chaînes du récepteur des lymphocytes T.*

En réalité les gènes V1 proprement dits codent seulement pour les acides aminés 1 à 96 de la partie variable de la chaîne légère 1 d'immunoglobuline. On a découvert ensuite que les acides aminés 97 à 107 qui appartiennent toujours à la région variable, et plus particulièrement à la région CDR3, étaient codés par un petit segment génétique supplémentaire, dit **gène J**1, dont il existe **5** variants différents sur l'ADN génomique.

Dans le lymphocyte B immature alors que les chaînes lourdes 1 *sont déjà apparues on assiste à un phénomène de translocation c'est-à-dire à un rapprochement au hasard d'un des gènes V*1 *de l'un des gènes J*1 *avec élimination de la partie intermédiaire. Cet ensemble VJ-C sera transcrit en un ARN messager primitif intra-nucléaire beaucoup plus long que l'ARN messager définitif cytoplasmique. Entre les deux un processus d'épissage ("splicing") aura rapproché VJ de C, cet ensemble sera finalement traduit au niveau du polysome cytoplasmique en une chaîne légère finale (laquelle s'assemblera, on l'a déjà dit, dans l'ergastoplasme à la chaîne lourde qui vient de naître pour former l'immunoglobuline entière).*

Pour les chaînes légères 1 (gènes situés sur le chromosome 22, sur une étendue de 1000 kb), l'organisation est tout à fait comparable à la seule différence près qu'il existe 52 gènes V1 dont 26 à 29 sont fonctionnels répartis en 10 familles, et plus d'un gène C1 (au moins 4 à 7 expliquant les isotype Kern, Oz etc...) et 4 à 7 gènes J1, associés sous forme de couples J11-C11, ..., J17-C117, dont 4 sont fonctionnels.

On distingue donc **quatre étapes** conduisant à la production de chaînes légères pour le lymphocyte B. Dans l'ADN en configuration germinale (ou embryonnaire) une recombinaison somatique rapproche un gène V d'un gène J avec excision de l'ADN intercalaire. La deuxième étape de transcription conduit à un mARN primaire de l'ensemble V-J-intron-C. La troisième étape d'épissage élimine l'intron et aboutit à un mARN mature qui est finalement traduit en chaîne polypeptidique par la quatrième étape.

IX.3.3.2. Gènes des chaînes lourdes

L'organisation des gènes des chaînes lourdes est un peu plus complexe. Le **locus IgH** s'étend sur 1350 kb. Comme on l'a déjà dit il n'existe qu'une seule grande famille de **gènes V_H** (au nombre de 87 dont **46 à 50** de fonctionnels, répartis en 7 familles), tous situés sur le chromosome 14 chez l'homme de même que les gènes commandant aux diverses parties constantes. Mais la variabilité est ici accrue, apportée non seulement par l'existence de **gènes J** différents des précédents au nombre de **6 gènes** fonctionnels et de 3 pseudo-gènes s'étendant sur 2,6 kb, , mais encore par des petits segments génétiques supplémentaires appelés D pour diversité ; il existe environ **27 gènes D** chez l'homme. Le locus D s'étend sur plus de 70 kb et les gènes D sont regroupés en 7 familles.

Tous ces groupements de gènes sont éloignés les uns des autres dans l'ADN primitif génomique et se rapprochent progressivement par des recombinaisons ou translocations successives pour être finalement traduits en chaînes lourdes au niveau des lymphocytes B. C'est ainsi que dans le lymphocyte pro-B s'opère le premier réarrangement des gènes des chaînes lourdes, plus précisément de la chaîne lourde μ qu'on trouvera synthétisée à l'intérieur du lymphocyte pré-B.

Il y a d'abord rapprochement, au hasard, d'un gène D et d'un gène J, puis l'un des gènes V_H se rapproche de D formant ainsi un complexe VDJ qui reste au début éloigné des gènes des parties constantes C. Le rapprochement se fera au niveau de l'ARN messager primordial par un phénomène d'épissage comparable à celui décrit pour les chaînes légères et au niveau de l'ARN messager final opérationnel cytoplasmique on aura bien la séquence VDJC traduite en la chaîne lourde correspondante. Le **CDR3** est donc codé par **l'extrémité 3' du gène V, le gène D et l'extrémité 5' du gène J.** Il comporte 1 à 13 acides aminés.

Comparativement aux chaînes légères il existe donc une étape supplémentaire pour les chaînes lourdes puisqu'il existe **deux réarrangements : d'abord D-J, puis V-DJ.**

IX.3.3.3. Mécanismes des réarrangements

Ces mécanismes sont relativement complexes, originaux bien qu'on les retrouve de façon tout à fait comparable au niveau des chaînes constitutives du récepteur d'antigène des lymphocytes T (TCR).

Ils sont le fait d'une **recombinase (endonucléase et ligase)** qui reconnaît des signaux spécifiques en 5' et en 3' des gènes D, en 3' des gènes V et en 5' des gènes J. L'ADN intermédiaire est éliminé par délétion sous forme de boucle d'excision, qui sont dégradées : l'information génétique comprise entre les deux segments géniques rapprochés par recombinaison est définitivement éliminée.

Ces recombinaisons comportent une certaine imprécision dans les nucléotides participant aux jonctions V-J, responsable d'une diversité jonctionnelle : la coupure n'a pas forcément lieu à la limite du codon terminal de l'exon V, mais peut être décalée de 1 à 2 nucléotides : si le cadre de lecture du segment J est préservé, l'acide aminé 96 est alors substitué.

Ils sont sous la dépendance de séquences particulières de nucléotides, situées immédiatement en amont (5') et en aval (3') des séquences génétiques recombinées.

*On trouve d'abord une séquence de 7 nucléotides, un **heptamère** constitué de CACAGTG ou analogue, suivi par une séquence non conservée c'est-à-dire fort variable dite **espaceur** de 12 bases (soit un tour d'hélice de l'ADN) puis à nouveau une séquence conservée **nonamère** sur le thème ACAAAAACC. Précédant immédiatement tous les segments D et J on retrouve à nouveau 2 séquences signal, d'abord nonamère puis l'heptamère séparés par un espaceur non conservé de 23 (ou 24) paires de bases (soit deux tours d'hélice). Cette disposition permet à l'heptamère et au nonamère de se placer côte-à-côte sur l'hélice, et donc d'être ainsi accessibles aux recombinases. Les séquences heptamère et nonamère suivant les segments V_L, V_H ou D sont complémentaires de celles qui précèdent J_L, D ou J_H avec lesquelles elles se recombinent. On dit que les réarrangements s'opèrent selon **la règle de jonction 12/23** ; ce mécanisme particulier empêche un gène V de s'unir à un autre gène V, un D à un autre D, un J à un autre J, de même un gène V_H ne peut se joindre un segment J_H directement sans qu'il y ait jonction préalable DJ_H. Théoriquement la jonction J_HD est permise par la règle 12/23 mais pour des raisons inconnues elle ne se produit pas normalement.*

*Les recombinaisons se produisent grâce à une **recombinase**, enzyme contenant sans doute 2 protéines se liant à l'ADN l'une qui reconnaît la première séquence signal avec son espaceur de 12 paires de base et l'autre la seconde séquence signal avec l'espaceur de 23 paires de base. Deux gènes ont ainsi été isolés et appelés **RAG-1 et RAG-2** (pour "recombinase activating gene"). Les souris chez qui ces gènes ont été spécifiquement inactivés par recombinaison homologue (souris "knock-out" ou génétiquement invalidée) présentent un profond déficit immunitaire avec absence de lymphocytes B et T, appelé scid pour "severe combined immunodeficiency". D'autres protéines, Ku70, Ku86 et une protéine kinase ADN-dépendante interviennent également dans les mécanismes de recombinaison.*

La recombinaison V(D)J est une étape essentielle du développement des lymphocytes , B et T. Cette activité est soumise à plusieurs types de régulation, à la fois par les mécanismes de réparation de l'ADN, de contrôle de l'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 durant la différenciation des lymphocytes, de contrôle de la progression dans le cycle cellulaire, par des facteurs capables d'activer les éléments cis-régulateurs de la transcription des gènes d'Ig et du TCR, qui contrôlent l'accessibilité de ces gènes à la recombinase V(D)J.

Il existe également d'autres mécanismes de régulation, inconnus à ce jour, qui expliquent la spécificité de réarrangement selon la lignée (gènes des Ig dans le lymphocyte B et gènes du TCR dans le lymphocyte T), et l'ordre déterminé des réarrangement (chaîne lourde puis chaîne légère). Ces mécanismes doivent gouverner l'accessibilité de l'ADN à la recombinase.

La première étape du réarrangement est la coupure de l'ADN par la recombinase V(D)J aux niveaux des séquences signal de recombinaison, heptamère et nonamère, en respectant pour l'appariement la règle des espaceurs 12/23. Après coupure de l'ADN, les extrémités portants les séquences signal heptamère et nonamère sont ouvertes, alors que les séquences codantes sont fermées en épingle à cheveux. Durant les étapes ultérieures de la réaction, cette structure est ouverte et les séquences codantes sont modifiées (délétion et/ou addition de quelques nucléotides) avant d'être fusionnées. Si les segments géniques sont dans la même orientation de transcription, le fragment d'ADN les séparant est excisé du chromosome. Si ces segments sont en orientation inverse, ce fragment est inversé. La jonction des séquences heptamère/nonamère est donc soit portée par un fragment d'ADN circulaire, soit retenue sur le chromosome, selon que le réarrangement a lieu par délétion ou inversion.

La recombinase V(D)J n'est active que dans les lymphocytes B et T, ce que traduit la spécificité d'expression tissulaire des gènes RAG-1 et RAG-2. Les autres composants de la recombinase (exonucléase, ligase, polymérase...) sont exprimés dans tous les tissus. La protéine kinase activée par l'ADN (DNA-PK) est constituée des protéines Ku70, Ku86 et p350. Le complexe Ku70/Ku86 reconnaît les extrémités d'ADN en épingle à cheveux, s'y fixe et recrute la protéine p350 qui est l'unité catalytique. Sa fonction intervient dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

IX.3.3.4. Diversité jonctionnelle

Le phénomène de recombinaison fait vraisemblablement intervenir d'autres enzymes que les seules RAG-1 et RAG-2 pour apparier, couper, lier l'ADN de manière correcte, c'est-à-dire transcriptible. A ce stade apparaît la possibilité d'ajouter par complémentarité des nucléotides supplémentaires lors de la jonction V-J ou V-DJ qui, s'il sont dans un cadre de lecture correcte peuvent augmenter la diversité en ajoutant un ou deux acides aminés dans le CDR3 générant ainsi une diversité.

*Lors de la recombinaison entre deux segments variables (V-J, V-DJ et D-J), l'ADN est clivé sur ses deux brins précisément au niveau des motifs heptamères. Il se forme alors au niveau des extrémités codantes une boucle en épingle à cheveux constituée de nucléotides complémentaires sur chaque brin. Celle-ci est ensuite clivée par une endonucléase de façon aléatoire, ce qui libère donc des séquences palindromiques (capables d'être lues dans les deux sens). On les appelle **nucléotides P**. Ce mécanisme d'ajout de nucléotides, pourvu qu'il ne perturbe pas le cadre de lecture, est opérationnel pour les deux types de chaînes, lourdes et légères.*

Pour les chaînes lourdes ce mécanisme est supporté par une enzyme, la **terminal deoxynucléotidyl transférase** (TdT), indépendante de toute matrice d'ADN et active qu'au stade précoce de la différenciation des lymphocytes B. On parle de **diversité N** (pour nucléotide).

Dans les deux cas, une exonucléase enlève les nucléotides non appariés, avant réparation et ligation de l'ADN.

La diversité jonctionnelle repose sur les nucléotides P, les nucléotides N et l'acitivité exonucléasique : elle aboutit soit à un ajout, soit à une soustraction de nucléotides.

IX.3.3.5. Génération de la Diversité

On voit donc que dans la moelle osseuse, qui est l'organe lymphoïde primaire de différenciation des lymphocytes B, en dehors de toute stimulation antigénique, trois

mécanismes concourent à la génération de la diversité : la **recombinaison génétique, la diversité jonctionnelle** et l'**appariement** des chaînes lourdes et des chaînes légères.

chaîne	H	1	1
segment			
V	50	34	29
D	30	0	0
J	6	5	4

En effet, à partir du tableau ci-dessus, un rapide calcul montre qu'avec environ 50 gènes V_H, 30 gènes D et 6 gènes J on a 9000 possibilités pour la région V_H. Le même calcul pour les chaînes K (34 V_K et 5 J_K) retrouve 170 possibilités et donc 1,53-10^6 possibilités d'appariement chaîne lourde/chaîne 1. Il a été calculé que la diversité jonctionnelle multipliait environ par un facteur 100 la diversité. Par les seuls mécanismes impliqués au niveau de l'ADN génomique on arrive donc à une diversité de l'ordre de 10^9.

Un dernier mécanisme, intervenant lui au stade de lymphocyte B mature stimulé par son antigène spécifique est représenté par les **mutations somatiques** qui, paradoxalement, semblent se focaliser sur les régions V des Ig au cours des mitoses consécutives à l'expansion clonale. Ces mutations entraînent surtout une maturation d'affinité des anticorps (voir cours différenciation B).

IX.3.3.6. Explication de l'exclusion allélique (ou haploïdie fonctionnelle)

Comme on l'a déjà dit le premier réarrangement se produit au niveau du chromosome 14 où se situent les segments génétiques pour les chaînes lourdes. Un segment D au hasard se joint à un segment J_H quelconque, puis si il est productif un V_H s'unit à D-J_H ; chaque réarrangement a environ 30 % de chance de réussir. Les réarrangements sont tentés sur les deux chromosomes simultanément et lorsque le premier a échoué chaque chromosome tente à nouveau jusqu'à ce que le stock de segments D et J soit épuisé. Lorsque c'est le cas et qu'aucun des réarrangements n'a été productif la cellule meurt comme un "joueur de roulette russe ayant joué à son tour et ayant perdu" (KLEIN). Aussitôt que l'un des deux chromosomes a réussi à produire un réarrangement complet et productifs VDJ la première chaîne lourde est produite (en général μ) et cette synthèse stoppe probablement toute tentative ultérieure de réarrangement sur les deux chromosomes 14. Le réarrangement est maintenant fixé et comme la probabilité de réussir des réarrangements simultanés sur les deux chromosomes est extrêmement faible, ceci explique le phénomène d'exclusion allélique.

L'expression d'une chaîne μ en surface bloque les recombinaisons des gènes VH sur l'autre chromosome 14 et initie celles des gènes VL, dans l'ordre 1111. *Le premier réarrangement fonctionnel bloque les suivants.*

Les mêmes phénomènes se produisent ensuite au niveau de chromosome 2 pour les chaînes légères 1 *et si l'on aboutit à un échec au niveau des deux chromosomes 2 la cellule passe en dernier à l'activation des chromosomes 22 pour les chaînes légères* 1.

Un lymphocyte B différencié n'exprime donc qu'**un seul gène recombiné VHDJH** et **une seule chaîne légère,** 1 **ou** 1**,** ce qui explique l'exclusion allélique. Que ce soit pour la chaîne lourde ou légère, un seul des deux chromosomes est porteur d'un réarrangement productif. L'autre est soit en configuration germinale, soit porteur d'un réarrangement abortif.

IX.3.3.7. Mécanisme du "Switch"

Une fois obtenus, les réarrangements fonctionnels d'une chaîne lourde (VDJ) et d'une chaîne légère (VJ), dont l'association définit une spécificité anticorps, sont **définitifs** et caractérisent un **clone** lymphocytaire. Cependant au niveau du locus IgCH, sur le chromosome

14, le gène réarrangé VDJ a la possibilité de s'apparier avec différents gènes codant pour les parties constantes.

A la différence des gènes C_L constitué d'un seul exon codant pour un seul domaine, les gènes codants pour les parties constantes des chaînes possèdent 3 ou 4 exons selon l'isotype.

Sur le chromosome 14, chez l'homme, à la suite des gènes codant pour les parties variables on trouve une série de 11 gènes pour les parties constantes à savoir dans l'ordre de 5' vers 3' μ, 1 , 13, 11, 11, 91, 11, 12, 14, 1, 92. Les gènes 11 et 11 sont des pseudogènes et ne sont pas exprimés. Chaque gène est précédé d'une séquence dite "**Switch**" ou de **commutation** qui permet à l'ensemble VDJ de "s'accrocher" à un gène C différent.

*Les régions S sont composées de séquences répétées en tandem du type $(GAGCT)_n$. On comprend bien étant donné la place toute initiale du gène Cμ la raison pour laquelle c'est précisément l'isotype IgM qui s'exprime en tout premier. On constate qu'une telle séquence "switch" n'existe pas en avant du gène C*1 *expliquant ainsi la présence très fréquente simultanée d'IgM et d'IgD à la surface du même lymphocyte B au début de sa carrière, avant qu'il ne soit déterminé en isotype définitif en fonction de l'antigène et des signaux "helper" reçus des lymphocytes T. L'obtention de l'IgM ou de l'IgD s'explique par l'épissage alternatif d'un mARN primaire VDJ-Cμ-C*1.

*Le gène C*1 *comprend 8 exons répartis sur 10 kb. A l'extrémité 3' se trouve un codon* 1*s pour l'extrémité C-terminale de la forme sécrétée et 2 codons* 1*m1 et* 1*m2 pour la forme transmembranaire (cf infra).*

Le lymphocyte B immature n'exprime qu'une IgM membranaire. Ultérieurement la coexpression de l'IgM et de l'IgD définit le lymphocyte B mûr naïf, qui représente 70 % des petits lymphocytes B sanguins. Après stimulation par l'antigène, ces lymphocytes perdent l'expression de l'IgD pour beaucoup, devenant, soit des plasmocytes sécréteurs d'IgM ou de rares lymphocytes mémoire, soit pour une infime minorité perdent leur IgM et deviennent des plasmocytes à IgD.

Après stimulation par l'antigène, le lymphocyte B qui exprime une IgM de membrane peut se différencier en plasmocyte sécréteur d'IgG, d'IgA ou d'IgE. Cette commutation, ou "switch", est rendue possible par l'existence des régions "switch" situées en 5' de caque région constante. Elle aboutit à la production d'anticorps qui conserve leur spécificité anticorps (**même VDJ**) associée à des **propriétés effectrices variables** avec les différents isotypes.

Une seule partie de la région Sμ est délétée lors de la première commutation, expliquant que des commutations ultérieures soient possibles à partir de la portion restante.

Les **lymphocytes T** jouent un rôle important dans la commutation, grâce aux **cytokines** qu'ils sécrètent et aux **contacts** qu'ils établissent avec les lymphocytes B. Les cytokines agissent en stimulant ou en réprimant les régions S. Ainsi l'IL-4 favorise la synthèse de l'IgE et de l'IgG4, alors que le TGF9 ("transforming growth factor 9) stimule la synthèse d'IgA. Les contacts cellulaires entre le lymphocyte B et le lymphocyte T pour permettre cette commutation sont assurés par un couple de molécules spécifiques (respectivement **CD40** et son ligand, **CD40L** ou **CD154**).

La preuve en est fournie par le très rare déficit de l'immunité humorale avec hyper-IgM, qui se traduit par une absence d'IgG et d'IgA contrastant avec un taux élevé d'IgM, secondaire à un défaut de commutation consécutif à l'absence de CD40L fonctionnel sur le lymphocyte T.

IX.3.3.8. Formes membranaire et sécrétée des immunoglobulines

Toutes les molécules d'immunoglobulines existent sous deux formes, l'une intégrée à la membrane plasmique et exprimée à la surface de la cellule B en tant que récepteur, l'autre sécrétée dans les fluides tissulaires en tant qu'anticorps soluble. Tout lymphocyte B a la possibilité de produire les deux formes. Comme il a déjà été indiqué ces

deux espèces moléculaires partagent exactement les mêmes chaînes légères et ont des chaînes lourdes identiques sauf un court segment à l'extrémité C terminale qui représente la région transmembranaire suivie par une courte région cytoplasmique.

Ces deux formes d'immunoglobulines sont produites à partir du même ARN primaire et c'est seulement pendant l'épissage de ce transcrit que la décision sera faite de la forme définitive devant être produite.

Nous allons reprendre un peu plus en détail ce qui se passe au niveau de la chaîne lourde µ. En réalité il n'existe pas un seul gène Cµ mais 4 exons correspondant chacun aux domaines constants de la chaîne lourde. Le quatrième exon de ce gène contient à son extrémité 3' un segment codant pour les 20 derniers acides aminés caractéristiques de la forme sécrétée avec un site de branchement pour un groupement prosthétique glucidique, spécifique de la forme sécrétée. Cette séquence est suivie par une région non traduite et se termine par un site de polyadénylation. Plus loin en aval (3') on trouve deux courts exons dits M1 et M2 qui codent pour les régions transmembranaire et cytoplasmique de la chaîne. La portion intra-membranaire est constituée d'environ 24 acides aminés hydrophobes qui permettent l'ancrage dans la membrane plasmique. L'exon M2 se termine par une autre région non traduite en 3' ainsi qu'un deuxième site de polyadénylation. Normalement le gène Cµ est transcrit tout du long jusqu'à l'exon M2 et même un peu au-delà ; le transcrit primaire contient donc l'information pour les 20 acides aminés caractéristiques de la forme sécrétée ainsi que les 40 acides aminés propres à la forme membranaire. Pour produire la forme sécrétée la cellule utilise le premier site de polyadénylation de l'exon Cµ4 et ampute tout ce qui se trouve au-delà de ce site en particulier les exons M1 et M2. Au contraire pour produire la forme membranaire il excise le segment responsable de la forme sécrétée au niveau de l'exon Cµ4.

Ce mécanisme d'**épissage** dit **alternatif** se produit de façon analogue pour toutes les autres chaînes lourdes d'immunoglobulines. L'IgM membranaire a une portion intracytoplasmique très courte formée de quelques acides aminés seulement, insuffisantes pour transmettre à elle seule le signal d'activation c'est-à-dire de reconnaissance de l'épitope par l'extrémité Fab de la molécule.

Ceci est vrai aussi pour les autres chaînes lourdes puisque les portions intracytoplasmiques sont respectivement de 3 acides aminés pour les chaînes lourdes µ et 1, 14 pour les chaînes 9 et 28 pour les chaînes 1 et 1. On a mis en évidence des **chaînes accessoires transmembranaires** ayant une partie intracytoplasmique nettement plus longue d'environ 50 acides aminés : il s'agit de la chaîne **Ig-**9 unie à une chaîne dite **Ig-**9 par un pont disulfure, qui seront développées dans le cours sur le lymphocyte B (voir cours immunorécepteurs et différenciation B).

IX.3.3.9. Régulation de l'expression des gènes d'immunoglobulines

L'expression des gènes dans les cellules eucaryotes est contrôlée par des éléments transcriptionnels qui sont susceptibles de fonctionner soit en cis, soit en trans. Les gènes d'Ig ne sont réarrangés et exprimés que dans les cellules de la lignée lymphocytaire B, ce qui s'explique par des éléments de régulation propre;

On a reconnu un ensemble de régions régulatrices. On distingue :

*a) une région **promotrice** située en 5' de tous les exons V. Ces régions comportent un certain nombre de signaux, dont une "TATA BOX", site de liaison de l'ARN polymérase II, ainsi qu'un octonucléotide hautement conservé (ATGCAAAT). Cet octonucléotide, situé 70 à 90 nucléotides en 5' du site d'initiation de la transcription est la cible de protéines régulatrices spécifiques des lymphocytes (**Oct-1** et **Oct-2**), qui après liaison, activent le promoteur.*

Des promoteurs ont également été retrouvés en 5' des gènes D. Ainsi les segments DJ peuvent-ils être transcrits dans les lymphocytes pro-B, donnant naissance à des protéines appelées Dµ.

*b) des régions activatrices ("**Enhancer**") complexes.*

*c) des facteurs protéiques se fixant sur le DNA au niveau des séquences promotrices et activatrices ont été caractérisés : un des plus connus est le facteur **NF-**1**B** qui n'est pas spécifique de la lignée B mais conditionne la transcription des gènes* 1 *réarrangés.*

*Des protéines régulatrices spécifiques contrôlent l'**état de la chromatine** qui commande l'accessibilité des régions promotrices et "enhancer" aux recombinases. L'existence de protéines régulatrices spécifiques selon la nature T ou B du lymphocyte explique que l'absence de réarrangement des gènes du TCR soit la règle dans les lymphocytes B, et vice versa malgré la nature vraisemblablement identique des recombinases des deux types de cellules.*

*De plus les réarrangements rapprochent le promoteur situé en amont (5') du gène V de l'"enhancer" situé dans l'intron J-C et de ceux situés en aval (3') du gène C: il en résulte une augmentation de la transcription. Donc, outre la génération de la diversité, les réarrangements géniques participent à la **régulation de l'expression** des gènes des immunoglobulines.*

IX.3.4. Origine de la diversité des anticorps

*Avant l'ère de la biologie moléculaire, les biochimistes comme PAULING défendaient des **théories informatrices** selon lesquelles l'antigène pénétrant à l'intérieur de la cellule immuno-compétente y jouait le rôle de moule, d'inducteur de la configuration spatiale du site anticorps spécifique. Elles sont aujourd'hui totalement périmées.*

*Tous les immunologistes sont d'accord pour admettre l'une des variantes des **théories sélectives**. Le prototype en est la théorie de la sélection clonale de BURNETT qui postule la formation pendant la vie embryonnaire d'un nombre considérable de clones de lymphocytes, chacun était spécialisé pour la reconnaissance, grâce à ses récepteurs de surface, d'un déterminant antigénique particulier.*

Pendant longtemps il y a eu des discussions acharnées entre tenants de la théorie germinale ou de la théorie somatique de la diversité des anticorps. Les connaissances actuelles très approfondies sur les gènes d'immunoglobulines ont en grande partie permis de reconcilier les opposants. Comme on vient de le voir, une grande partie de la diversité est inscrite dans le génome ; en effet l'analyse combinatoire en fonction des nombres de gènes V annoncés, des gènes D et J permet déjà de calculer le nombre considérable de conformations possibles pour les chaînes lourdes (30 000) et les chaînes légères (1 000). Si l'on admet que chacune d'entre elles peut de façon aléatoire s'associer à sa partenaire pour former un nouveau site anticorps, on arrive à des chiffres considérables de sites différents. De plus il est certain qu'il existe une certaine variation somatique due à une certaine imprécision dans les phénomènes de recombinaisons ou translocations. C'est ainsi qu'il existe un point "chaud" à l'acide aminé 96 ; ce résidu est extrêmement variable d'une chaîne légère 1 *à une autre, laissant supposer qu'il existe une certaine souplesse dans la recombinaison VJ. Il en est de même pour les autres segments génétiques au niveau des chaînes lourdes par exemple. L'association de ces deux types de diversification auxquels s'ajoutent de nombreuses mutations somatiques fait que l'on atteint très facilement le nombre de* 10^8 *variétés d'anticorps représentant une estimation raisonnable du nombre des spécificités présentes pour un individu donné.*

X - SYNTHÈSE DES IMMUNOGLOBULINES

X - 1 - MÉTHODES D'ÉTUDE

Le plasmocyte peut être étudié soit par immunofluorescence intra-cytoplasmique directe sur frottis médullaire ou sur coupe de tissus, soit par immuno-enzymologie sur coupe de tissus. La technique d'hémolyse localisée en plage de JERNE permet d'apprécier in vitro la production d'immunoglobulines.

X - 2 - RÉSULTATS

Les **immunoglobulines** représentent **10 à 20 % des protéines synthétisées** par le **plasmocyte**, alors que le chiffre est de **0,5%** pour le **lymphocyte B**. Le plasmocyte n'exprime plus à sa surface ni immunoglobuline, ni antigène HLA de classe II. Il n'a donc plus de possibilité de contact avec l'antigène ou le lymphocyte T auxiliaire $CD4^+$Th2. Il ne peut donc que synthétiser et sécréter des anticorps, ceci pendant les deux semaines de sa durée de vie. N'ayant plus aucune possibilité de contrôle via le BCR ou le lymphocyte T, la réponse anticorps ne cesse qu'avec la disparition du plasmocyte producteur.

Un plasmocyte donné synthétise une immunoglobuline dont la **spécificité anticorps** est **unique** : l'idiotype des immunoglobulines produites par un plasmocyte est donc identique. Le plasmocyte n'étant plus accessible au contrôle du lymphocyte T CD4Th2, l'isotype et l'allotype éventuel sont aussi identiques.

*Il existe **deux types de polysomes**: un pour la synthèse des chaînes lourdes et un pour celle des chaînes légères. La constante de sédimentation est de 17 S pour les premiers qui fabriquent des chaînes lourdes en une minute. Pour les seconds, de 13 S, la durée de synthèse n'est que de 30 secondes. Ceci s'explique par l'existence de deux types d'ARN messagers.*

L'assemblage des deux types de chaînes se fait dans le réticulum endoplasmique. Le stock des chaînes légères est à renouvellement rapide. Il est variable selon les classes. Pour les IgA, il y a d'abord appariement des deux chaînes 9*, puis ajout successif de deux chaînes légères. La séquence des événements peut donc s'écrire :*

- $H + H \rightarrow H_2$
- $H_2 + L \rightarrow H_2L$
- $H_2L + L \rightarrow H_2L_2$

Pour les IgG1, il y a d'abord appariement chaîne lourde/chaîne légère, puis dimérisation, soit la séquence:

- $H + L \rightarrow HL$
- $HL + HL \rightarrow H_2L_2$

Nous avons vu que l'addition des **sucres** se fait dans l'ergastoplasme lisse et l'appareil de **Golgi.**

Pour les isotypes qui sont susceptibles d'être sécrétés sous forme de **polymère** (IgM et IgA), l'étape de polymérisation, qui nécessite l'existence d'un octodécapeptide en C-terminal présent uniquement sur les chaînes μ et 9, a lieu immédiatement en sous-membranaire avant la sécrétion. Elle fait intervenir une enzyme **sulfhydrile oxydase**, cuivre-dépendante.

*En physiologie cette synthèse est équilibrée : le plasmocyte produit autant de chaînes lourdes que de chaînes légères. En pathologie, dans le **myélome multiple des os** ou maladie de **KAHLER**, l'immunoglobuline monoclonale qui est produite par le clone de plasmocytes malins a une structure normale. Les seules anomalies sont quantitatives : du fait de l'expansion clonale incontrôlée des plasmocytes malins, leur produit de sécrétion (immunoglobuline) est en quantité anormalement excessive, responsable du pic immunoélectrophorétique observé. Parfois il existe un déséquilibre de synthèse, ou de dégradation, des deux types de chaînes expliquant,*

par un excès du pool de chaînes légères, l'existence d'une ***protéine de BENCE JONES*** *uniquement urinaire, ou sérique et urinaire.*

XI. PHYLOGÉNIE DES IMMUNOGLOBULINES

XI.1. EVOLUTION DES IMMUNOGLOBULINES

L'évolution du système immunitaire des vertébrés, comme celle de tout système physiologique complexe constitué d'un grand nombre d'éléments, peut être divisé en deux phases:

- celle de l'origine du système où l'on assiste à la mise en place des éléments et à leur assemblage en un système immunitaire élémentaire

- celle de l'évolution proprement dite du système une fois celui-ci constitué, avec les variations qu'il va subir.

Certains invertébrés possèdent des sortes d'agglutinines qu'on ne saurait assimiler à de véritables anticorps. Par contre ces animaux sont déjà capables de rejeter des greffes, et possèdent donc vraisemblablement une sorte d'immunité cellulaire.

Les premiers anticorps apparaissent chez les vertébrés les plus primitifs telle la myxine et la lamproie déjà plus évoluée. Tous les vertébrés peuvent fabriquer des anticorps synthétisés par les lymphocytes B, capables de reconnaître de façon spécifique un vaste spectre de déterminants antigéniques. En étudiant de manière plus détaillée les différentes classes de vertébrés, on s'est aperçu qu'il existe des différences dans le mode d'obtention et le degré de la diversité de ce répertoire B. Les deux seuls groupes vraiment distincts sont les Agnathes (sans mâchoire) et les Gnathostomes (avec mâchoire)

En ce qui concerne les régions constantes des chaînes lourdes, la plupart des poissons primitifs, Agnathes et Chondrichtyens n'ont qu'une seule sorte d'immunoglobuline, une espèce d'IgM ancestrale sans chaîne J. L'IgM se polymérise (avec chaîne J) à partir des requins.

Plus tard, chez les Dypneustes, apparaît une seconde classe d'immunoglobuline légère à rapprocher de l'IgG bien qu'elle ne soit pas exactement superposable. L'IgA apparaît pour la première fois chez les oiseaux. L'IgE semble être tardive dans l'évolution. On ne la retrouve que chez les mammifères.

Les différents domaines constituant ces isotypes semblent avoir évolué indépendamment les uns des autres pour constituer les différentes chaînes lourdes: il est en effet difficile de retrouver des caractères spécifiques des IgM dans tous les domaines d'un même gène Cμ par exemple. Il est plus fréquent de trouver, dans une espèce inférieure, un domaine proche d'une IgM de mammifère, un autre d'une IgG et un troisième d'un récepteur T ou d'une molécule du système majeur d'histocompatibilité.

En ce qui concerne les chaînes légères, la situation est plus confuse, les Vertébrés inférieurs pouvant en effet disposer d'un plus grand nombre d'isotypes que les Mammifères. Les rapports entre ces isotypes et les chaînes légères 1 *et* 1 *ne sont pas clairs, mais les données suggèrent cependant que la duplication ayant donné lieu à l'émergence des chaînes légères* 1 *et* 1 *a eu lieu après la séparation des lignées conduisant aux Chondrichthyens et aux Mammifères, mais avant la divergence conduisant aux Amphibiens et aux Mammifères, il y a environ 400 millions d'années.*

XI.2. SIMILITUDES ET DIFFERENCES

En comparant les gènes des régions variables des immunoglobulines de vertébrés, on observe une ***remarquable conservation de l'architecture générale****: toutes possèdent les trois régions hypervariables ou CDR, alternées avec quatre régions charpente, le tout constitué de feuillets plissés* 9 *reliés par des boucles* 9*. Dans toutes les espèces, c'est la même mécanique recombinatoire qui aboutit à un gène fonctionnel: un réarrangement V-J pour les chaînes légères, deux réarrangements (D-J et V-DJ) pour les chaînes lourdes. La structure de chaque gène, fragmenté en plusieurs éléments pourvus de signaux de recombinaison conservés (heptamère et nonamère séparés par 12 ou 23 bases) est pratiquement identique du requin à l'homme. Seuls diffèrent les mécanismes de régulation.*

Une différence majeure identifie la séparation Chondrichtyens-Ostéichtyens. Pour les chaînes lourdes des premiers, ce sont des unités entières VDJ (au nombre de 200) qui précèdent les loci des gènes constants CH. Il n'y a pas de réarrangement inter-unités; la source de diversité en est donc moindre. A partir des Ostéichtyens, on retrouve la disposition des Mammifères, à savoir un groupement de gènes V à proximité d'un groupement de gènes J et d'un groupement de gènes D pour les chaînes lourdes. Cette disposition permet un plus grand nombre de réarrangements combinatoires, ce qui accroît d'autant la source de diversité.

L'organisation des gènes n'explique pas tout. Chez les vertébrés inférieurs l'hétérogénéité est bien moindre que chez les Oiseaux et les Mammifères. Les processus de diversification somatique (conversion et hypermutation) semblent plus développés chez ces derniers et être responsables de la plus grande diversité

observée. Ainsi la conversion génique est le mécanisme majeur chez le poulet, alors que ce sont les hypermutations somatiques au niveau du système immunitaire muqueux chez le mouton.

Nous avons vu que le rapport 1 / 1 *varie avec les espèces (cf III). De plus la souris possède un plus grand nombre de gènes V*1*, alors qu'elle n'a que deux gènes V*1*. Chez la souris il n'y a d'exprimé qu'un seul gène C*1*, alors que sur les quatre gènes C*1*, trois le sont. Chez la poule il n'y a qu'un seul gène V*1 *fonctionnel capable à lui seul d'engendrer par recombinaison et mutation somatique une diversité.*

*Il y a une conservation au cours de l'évolution: chez l'homme, le rat, la souris et le lapin 39 acides aminés sur 116 sont identiques pour le gène C*1*. Ces résidus interviennent pour le déploiement du domaine dans l'espace, analogue pour les quatre espèces.*

*Alors que les homologies entre les sous-classes d'IgG humaines sont de 90 à 95 %, elles ne sont que de 60 à 70% pour celles de la souris, sauf pour les sous-classes IgG2a et IgG2b. Par contre pour ces deux sous-classes le nombre de variants allotypiques est très élevé. On relève plus de 12 variants allotypiques s'expliquant par des mutations (8 dans le domaine C*1*2 et 28 dans le domaine C*1*3 entre les souris BALB/c et C57B1).*

Il existe une forte conservation des IgM au cours de l'évolution: jusqu'à 81% d'homologie entre les chaînes µ humaine et canine, alors que l'homologie moyenne inter-espèce n'est que d'environ 60% pour les chaînes 1, 1 *et* 1*. Les IgM sont toujours polymères, 4 , 5 ou 6 sous-unités. Très conservée, l'IgM des vertébrés inférieurs ressemble le plus à l'IgM des vertébrés supérieurs que celle-ci ne ressemble à l'IgG ou à l'IgA d'espèce nettement plus proche d'elle.*

*Pour l'IgD il existe une forte différence entre la souris et l'homme. Celle-ci ne possède pas de domaine C*1*2.*

XI. 3. Les IgG selon les especes

Il existe toujours plusieurs sous-classes d'IgG dans toutes ces espèces étudiées, au moins 2 ; l'IgA est souvent représentée par deux sous-classes tandis que l'IgM, l'IgE n'ont qu'une sous-classe : quant à l'IgD les connaissances sont très fragmentaires. Pour les concentrations c'est toujours l'IgG qui domine mais dans des rapports allant de 1 à 10 des poulets aux bovidés.

Quelques indications particulières selon les espèces :

- IgG (T) du cheval : plus sucrée que l'IgG classique, ne fixe pas le complément, est abondante dans les sécrétions, a une demi-vie d'environ 20 jours.

- IgG1 bovine : représente la moitié des IgG, c'est le composant majeur du lait de vache, alors que c'est l'IgA dans l'espèce humaine et chez le lapin, l'IgG_1 ne provoque pas la phagocytose par les monocytes ni les polynucléaires, l'IgG_2 ne fixe pas le complément, son taux est héréditairement haut ou bas.

- L'IgG du chat domine dans le sérum où le colostrum et le lait alors que l'IgA est présente dans d'autres fluides.

- L'IgG de lapin : on en connaît qu'une seule sous-classe, l'IgA est dominante dans le lait.

- Les IgG de souris avec 4 sous-classes : IgG1, 2a, 2b, 3, de structures très voisines. On a l'habitude de préciser maintenant l'isotype des anticorps monoclonaux de souris.

- L'IgG du cobaye : IgG_1 majoritaire, IgG_2 minoritaire avec des propriétés du Fc très différentes. L'IgG1 ne fixe pas le complément par la voie classique mais sensibilise le cobaye pour l'anaphylaxie. L'IgG2 fixe le complément par la voie classique, ne provoque pas l'anaphylaxie cutanée passive.

- L'IgG de chien : une seule sous-classe comme chez le lapin.

Il faut noter la différence de perméabilité du placenta selon les espèces :

- *chez la vache le placenta est imperméable mais les Ig passent abondamment la barrière intestinale dans les premiers jours qui suivent la naissance.*

PROPRIÉTÉS STRUCTURALES ET BIOLOGIQUES DDES IMMUNOGLOBULINES HUMAINES

immunoglobulines	IgM	IgD	IgG	IgG	IgG	IgG	IgA	IgA	IgE
PM de l'Ig (kD)	970	184	146	146	170	146	160 / 400	160 / 400	188
Constante de sédimentation (s)	19	7	6,6	6,6	6,6	6,6	7, 9 et 11	7, 9 et 11	8
sous-classe			IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	
Sous-unités (H2L2)	5	1	1	1	1	1	1, 2 ou n	1, 2 ou n	1
H	μ	δ	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	ε
PM de H (kD)	65	70	51	51	60	51	56	52	72
Nombre de CH	4	3	3	3	3	3	3	3	4
Région charnière	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Ponts di-S intercaténaire	1 (+1)	1	2	4	5 à 13	2	1 (+1)	1 (+1)	1
Autres chaîne J	Chaîne J	0	0	0	0	0	Chaîne J, pièce secrétoire	Chaîne J, pièce secrétoire	0
Allotype de H			Gm	Gm	Gm	Gm		A2m	
Sucres (%)	12	9 à 14	2 à 3	2 à 3	2 à 3	2 à 3	7 à 11	7 à 11	13
Sucres : nombre	5	6 à7	1	1	1	1	7	4 à5	6
valence	5 à 10	2	2	2	2	2	2 (4)	2 (4)	2
Taux sérique (g/L)	1,5	0,03	9	3	1	0,5	3	0,5	0,0001
% des Ig sériques	7	0,3	53	18	8	4	9	1	0,003
½ vie (jours)	5,1	2,8	21	20	7	21	5,8	5,8	2,5
% extra-vasculaire	10 à 20	25	60	60	60	60	60	60	50
Passage transplacentaire			oui	oui	oui	oui			
Liaison poly-IgR	oui						Oui (dimère)	Oui (dimère)	
Fixation C1q	oui		oui	oui	oui				
Liaison monocytes			oui		oui				
Liason PNN			oui	oui	oui	oui			
Liaison mastocytes, PNB									oui

RESUME

Les immunoglobulines, supports de l'activité anticorps et retrouvées dans les fractions gamma (et bêta) globulines à l'électrophorèse des protéines sériques, sont toutes bâties sur le même modèle: association de deux chaînes lourdes identiques d'environ 50 kD et deux chaînes légères identiques de 25 kD, stabilisées et liées par des ponts disulfures intra- et inter-chaînes. Il y a cinq types de chaînes lourdes (1, 1, 9, 1 et 1) définissant cinq classes d'anticorps (IgM, IgG, IgA, IgD et IgE). Les chaînes légères sont de deux types, 1 ou 1, et peuvent être associées à n'importe quel type de chaînes lourdes.

Les chaînes sont constituées de domaines qui sont des régions globulaires formées de 3 à 4 boucles polypeptidiques stabilisées par des feuillets plissés 9 et un pont disulfure intra-chaîne. L'analyse du degré de variabilité de la composition en acides aminés montre que le domaine N-terminal de chaque chaîne, lourde ou légère, est variable, et appelé respectivement VH et VL. Les domaines C-terminaux (1 pour la chaîne légère, CL) et 3 ou 4 pour les chaînes lourdes (CH) sont eux relativement invariants. L'immunoglobuline présente donc une dualité structurale qui explique sa dualité fonctionnelle. Les régions VH et VL constituent le site anticorps et la valence de l'immunoglobuline est donc double. Une même immunoglobuline porte deux sites anticorps identiques. Ils peuvent s'associer à différents types de régions constantes qui dicteront des propriétés biologiques différentes.

La digestion enzymatique des immunoglobulines a permis d'affirmer cette dualité structurale: le clivage par la papaïne génère deux fragments Fab, chacun porteur d'un site anticorps, et d'un fragment Fc. Celui par la pepsine donne un seul gros fragment $F(ab')_2$, union des deux Fab réunis par leurs régions charnière, qui est la partie des chaînes lourdes entre les deux premiers domaines constants qui contient les ponts disulfures inter-chaînes lourdes et qui assure la flexibilité.

Au sein des régions V existent trois régions hypervariables ou CDR, séparées dans la séquence primaire par des régions charpente, mais proches dans l'espace après redéploiement de la molécule native. L'association des trois CDR du VH et des trois CDR du VL constitue le site de liaison à l'antigène, appelé paratope.

Les molécules d'immunoglobulines sont structuralement hétérogènes. On distingue trois niveaux de variabilité:

- la variabilité isotypique correspond à l'existence de différentes classes (5) et sous-classes (4 pour les IgG, 2 pour le IgA), toutes présentes chez tous les individus de l'espèce humaine. Sa définition sérologique (anti-isotype) est hétérologue.

- la variabilité allotypique correspond à l'existence de marqueurs antigéniques variables, reflétant des différences génétiques au sein de l'espèce humaine, pouvant donner lieu à une immunisation (anti-allotype). On décrit des allotypes pour la chaîne légère 1 (Km), la chaîne lourde 1 (Gm) associés aux sous-classes d'IgG et pour la sous-classe IgA2 (A2m). L'exclusion allélique ou haploïdie fonctionnelle, originalité du fonctionnement du lymphocyte B, est le processus par lequel ce dernier, en cas d'hétérozygotie pour un allotype, utilise soit le gène du chromosome d'origine maternelle, soit celui d'origine paternelle, mais en aucun cas les deux.

- la variabilité idiotypique est associée aux régions V, et plus particulièrement aux régions hypervariables. Elle est propre à chaque individu. Tout idiotype (anticorps 1 ou Ab1) pouvant engendrer un anti-idiotype (Ab2), capable à son tour de susciter la production d'un anti-anti-idiotype (Ab3), le système immunitaire fonctionne comme un réseau idiotypique de régulation. Certains anti-idiotypes (Ab29), capables d'inhiber la liaison de l'anticorps cible à son antigène, fonctionnent comme l'image interne de ce dernier.

RESUME : SUITE

Les anticorps sont des molécules bifonctionnelles. Leur première fonction est de se lier à l'antigène par leur fragment Fab (liaison paratope-épitope). Le fragment Fc n'a aucune activité anticorps, mais dicte le catabolisme et supporte les propriétés effectrices, qui pour certaines nécessitent la liaison préalable à l'antigène. Ces propriétés peuvent être directes ou résulter de l'interaction du Fc avec des récepteurs spécifiques.

Seules les IgM et les IgG1, IgG2 et IgG3 sont capables de fixer le C1q et d'activer la voie classique du complément. Seules les IgG sont capables de franchir le placenta. L'IgG est l'isotype sérique majeur et constitue le principal anticorps de la réponse secondaire à la plupart des antigènes. Elle agit comme opsonine pour favoriser la phagocytose, activer le complément et faciliter la cytotoxicité cellulaire grâce à des récepteurs Fc1R (CD64, CD32 et CD16).

L'IgM est un pentamère qui est l'isotype majeur de la réponse primaire. Cette structure et sa distribution principalement intra-vasculaire lui confèrent une forte activité agglutinante et un fort pouvoir hémolytique par activation du complément. A la surface du lymphocyte B, l'IgM monomère sert de récepteur pour l'antigène en association avec des molécules accessoires (CD79a et CD79b) nécessaires à la bonne transmission du signal.

L'IgA , dont on connaît deux sous-classes, est l'isotype majeur retrouvé au niveau des muqueuses, sous la forme d'IgA sécrétoire associant un dimère d'IgA, une chaîne J et une pièce sécrétoire, résultat du clivage du récepteur des polymères d'immunoglobulines exprimé au pôle basal des cellules épithéliales.

L'IgD a surtout une fonction de récepteur à la surface du lymphocyte B où elle est le plus souvent co-exprimée avec l'IgM.

L'IgE, isotype le moins représenté dans le sérum, a pourtant une grande importance en pathologie. Sa liaison au récepteur Fc1RI , exprimé sur les polynucléaires basophiles et les mastocytes, explique, après liaison aux allergènes, les mécanismes d'hypersensibilité immédiate après libération par ces cellules d'amines vaso-actives contenues dans leurs granules.

Les gènes codant pour les anticorps sont répartis en trois loci, sur trois chromosomes différents: 14 pour les chaînes lourdes, 2 pour les chaînes 1 et 22 pour les chaînes 1. Chacun de ces loci regroupe un nombre variable de segments génétiques différents qui codent pour un domaine (exon), séparés par des introns non-codants. La région variable est codée par deux types de gènes (gènes V et gènes J) pour les chaînes légères, et par trois pour les chaînes lourdes, puisque s'y ajoutent des gènes D. La génération de la diversité des anticorps décrit le processus par lequel un grand nombre de régions V peut être générée à partir d'un petit nombre de segments génétiques différents. Ceci est possible grâce: 1) à l'existence d'un nombre appréciable de gènes V1, V1 et VH; 2) un mécanisme de recombinaison génétique entre les segments génétiques V, D et J; 3) des diversités jonctionnelle et de recombinaison (diversité N); 4) des hypermutations somatiques ponctuelles et 5) des appariements multiples entre chaînes lourdes et légères.

La recombinaison intéresse d'abord les gènes VH et se fait dans l'ordre DJ, puis VDJ. Un réarrangement fonctionnel bloque toute recombinaison sur l'autre chromosome 14, aboutit à la synthèse d'une chaîne lourde μ, et enclenche les tentatives de réarrangements sur les gènes des chaînes légères, dans l'ordre 1111. Ceci explique l'exclusion allélique. Une fois réarrangé, un segment VDJ peut, grâce au mécanisme de commutation, s'associer à différents gènes constants de chaînes lourdes, codés dans l'ordre 5' μ, 1 , 13, 11, 11, 91, 11, 12, 14, 1, 92 3'.

POUR EN SAVOIR PLUS:

AUCOUTURIER P Immunoglobulines et fonction anticorps in BACH JF *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/sciences Flammarion, Paris, 1999 : 15-16;

DAËRON M *Le système immunitaire, ou l'immunité cent ans après Pasteur* INSERM/ Nathan Paris 1995

GARCHAN HJ Gènes des immunoglobulines in BACH JF *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/sciences Flammarion, Paris, 1999 : 23-34;

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 65-81

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1998

STROSBERG AD Immunoglobulines in BACH JF *Traité d'Immunologie* Flammarion Paris 1993: 269-340

TESTEZ-VOUS

1 - Quel(s) est (sont) l' (es) allotype(s) qui n'existe(nt) pas:

A - Lm
B - Gm
C - A1m
D - Km
E - Mm

2 - Les immunoglobulines de classe IgM:

A - sont définies par leur chaîne lourde 1
B - ont une région charnière ("hinge") sur leur chaîne lourde
C - ont un poids moléculaire de 970 kD
D - sont pentamériques
E - passent le placenta

3 - Parmi les classes d'immunoglobulines énumérées ci-dessous quel(lles) est (sont) celle(s) qui active(nt) le complément par la voie classique:

A - IgM
B - IgA2A2m(2)
C - IgG1
D - IgE
E - IgG4

4 - Les immunoglobulines de classe IgG:

A - possèdent quatre domaines constants sur leur chaînes lourdes
B - comportent en plus de leurs chaînes lourdes et légères une chaîne J
C - présentent quatre sous-classes
D - sont majoritairement intra-vasculaires
E - sont les plus représentées dans le plasma

5 - Deux isotypes d'immunoglobulines possèdent quatre domaines constants sur leurs chaînes lourdes. Lesquels?

A - IgG
B - IgA
C - IgM
D - IgD
E - IgE

6 - Les gènes constants C_H des chaînes lourdes des immunoglobulines:

A - codent pour les acides aminés les plus C-terminaux de la chaîne
B - comportent trois régions hypervariables
C - sont précédés d'une région facilitant la commutation ("switch"), à l'exception de Cδ

D - sont codés sur le chromosome 14
E - sont au nombre d'une dizaine

7 - Le deuxième domaine constant de la chaîne lourde d'une IgG appartient au fragment

A - Fab
B - $F(ab')_2$
C - Fc
D - Fd
E - Fv

8 - Le fragment Fc d'une immunoglobuline est responsable :

A - de la spécificité anticorps
B - de son aptitude éventuelle à fixer le complément
C - du contrôle de son catabolisme
D - de la fixation sur les mastocytes s'il s'agit d'une IgE
E - de son aptitude éventuelle à franchir le placenta

9 - La demi-vie plasmatique des IgG (à l'exclusion de la sous-classe IgG3) est de :

A - 12 heures
B - 24 heures
C - 3 jours
D - 3 semaines
E - 6 semaines

10 - Le réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines :

A - précède celui des chaînes légères
B - doit être fonctionnel pour la maturation ultérieure dans la lignée B
C - est induit par la stimulation antigénique
D - implique un mécanisme plus simple que pour une chaîne légère
E - aucune des réponses ci-dessus est exacte

11 - Il existe des gènes D au sein des gènes codant pour :

A - les régions variables des chaînes légères kappa
B - la région constante des chaînes légères lambda
C – la région constante des chaînes lourdes d'IgD
D - les récepteurs d'antigène des lymphocytes T (TCR)
E - les régions variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines

12 - Les questions suivantes ont trait aux immunoglobulines humaines :

A - le fragment $F(ab')_2$ est obtenu par l'action de la pepsine
B - le fragment Fc est obtenu par l'action de la papaïne
C - les idiotopes sont portés par le fragment Fc
D - la valence théorique des anticorps va de 2 à 10 selon les classes
E - le pourcentage de sucres portés par les IgG va de 3 à 12

13 - Les molécules de la superfamille des immunoglobulines:

A - ont toutes leurs gènes codés avec ceux des gènes des immunoglobulines sur le chromosome 14
B - ont toutes leurs gènes qui subissent des réarrangements géniques comme ceux des immunoglobulines
C - possèdent des domaines homologues aux domaines variables ou constants des immunoglobulines
D - comprennent, entre autres, les différentes chaînes des antigènes HLA
E - comprennent, entre autres, la chaîne J, qui sert à la polymérisation des IgM et des IgA

14 - l'IgM :

A - possède 8 valences théoriques
B - fixe facilement le complément par la voie classique
C - est le seul isotype présent chez les premiers vertébrés
D - persiste indéfiniment en réponse aux antigènes thymoindépendants
E - est fortement augmentée dans le sérum de malades atteints de myélome multiple des os

15 - L'IgA (immunoglobuline A):

A - est principalement une imunoglobuline membranaire
B - possède un polymorphisme allèlique pour l'une de ses sous-classes
C - est capable d'activer le complément par la voie classique
D - est capable de se lier au récepteur des immunoglobulines polymériques des cellules épithéliales
E - possèdent quatre domaines constants sur sa chaîne lourde

16 - L'idiotypie :

A - est portée par les régions constantes des immunoglobulines
B - est un système antigénique
C - est une simple vue de l'esprit
D - s'observe exclusivement chez le lapin
E - est en rapport avec la spécificité anticorps

17 - L'allotypie:

A - est portée par les régions constantes des immunoglobulines
B - est un système antigénique qui définit des sous-populations au sein d'une espèce
C - s'observe exclusivement sur les chaînes lourdes
D - s'observe exclusivement sur les chaînes légères
E - est en rapport avec la spécificité anticorps

18 - Indiquez quelles sont les normes de concentrations sériques de l'IgG chez l'adulte normal :

A - 15 - 45 mg/dL
B - 50 - 105 mg/dL
C - 60 - 190 mg/dL
D - 110 - 415 mg/dL
E - 780 - 1500 mg/dL

19 - Indiquez quelles sont les normes de concentrations sériques de l'IgA chez l'enfant :

A - 50 - 105 mg/dL
B - 60 - 190 mg/dL
C - 110 - 415 mg/dL
D - 780 - 1500 mg/dL
E - aucune réponse n'est exacte

LE DEVELOPPEMENT DU LYMPHOCYTE B

I - INTRODUCTION

II - LES ORGANES LYMPHOÏDES PRIMAIRES B

II-1-La moelle osseuse

II-1-1- Architecture de la moelle
II-1-2- Les cellules souches

II-2- La bourse de Fabricius

III- LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES B

III-1-Contact initial cellule stromale/précurseur B

III-2-Les quatre stades de différenciation

III-3- Marqueurs phénotypiques de différenciation

III-4- Contrôle des réarrangements

III-5- Produits des gènes 15 et V pré-B

III-6- Exclusion allèlique

IV- SELECTION DES LYMPHOCYTES B

IV-1- Tolérance B

IV-2- Production médullaire

IV-3- Les lymphocytes B $CD5^+$

V- LA PRODUCTION DES ANTICORPS

V-1- Le BCR

V-1-1- L'immunoglobuline de membrane
V-1-2- Les molécules Ig9 et Ig9
V-1-3- Les voies de signalisation
V-1-4- Les autres constituants du BCR
V-1-4-1- La molécule CD22
V-1-4-2- La molécule CD45
V-1-5- Les co-récepteurs
V-1-5-1 Le complexe CD19/CD21/CD81
V-1-5-2- La molécule CD32 ou récepteur Fc1RII

V-2- La réponse aux antigènes thymodépendants

V-2-1- Le deuxième signal
V-2-2- La tolérance périphérique
V-2-3- L'aide des lymphocytesT $CD4^+$Th2
V-2-3-1- La molécule CD40
V-2-3-2- La commutation isotypique
V-2-3-3- Les cytokines
V-2-4- Le ganglion lymphatique
V-2-4-1- Architecture du ganglion lymphatique
V-2-4-2- Le centre clair germinatif du ganglion
V-2-4-3- Les centroblastes
V-2-4-4- Les centrocytes
V-2-4-5- Les lymphocytes B mémoire et les plasmocytes
V-2-4-5-1- Les lymphocytes B mémoire
V-2-4-5-2- Les plasmocytes

V-3- La réponse aux antigènes thymoindépendants

LE DEVELOPPEMENT DU LYMPHOCYTE B : OBJECTIFS

Niveau A :

- **lymphocyte B : immunité humorale spécifique**
- **monospécificité du lymphocyte B**
- **citer les étapes de la différenciation B**
- **connaître les marqueurs de différenciation B spécifique**
- **composition du BCR, du préBCR**
- **connaître les corécepteurs**
- **connaître les kinases**
- **principes de la tolérance B**
- **centroblaste, centrocyte : définition, fonction**
- **définition des hypermutations somatiques**
- **lymphocyte B CD5+ : définition**

Niveau B :

- **citer les molécules et récepteurs impliquées dans la différenciation B**
- **mécanismes séquentiels de différenciation**
- **receptor editing**
- **rôle du centre clair germinatif**
- **antigènes thymo-indépendants**

LE DEVELOPPEMENT DU LYMPHOCYTE B

I - INTRODUCTION

Les lymphocytes B sont le support de **l'immunité humorale adaptative** qui repose sur la présence d'**anticorps** spécifiques, et donc transférable par le sérum. Cette immunité humorale est responsable des réactions d'hypersensibilité de type I (anaphylaxie), II (cytotoxicité) et III (complexes immuns).

Le récepteur d'antigène du lymphocyte B (**BCR** pour "B cell receptor") reconnaît directement les antigènes natifs, en solution ou à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, telles que les cellules folliculaires dendritiques.

*Nous rapellerons (cours sur les cellules de l'immunité) que cette reconnaissance fait intervenir son **paratope,** qui associe les deux régions variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, capable de se lier à l'**épitope** de l'antigène. Ceci est le support de la **spécificité** de la réponse humorale. Un lymphocyte B donné synthétise des molécules d'immunoglobulines qui portent toutes le même paratope. Selon le stade de différenciation de la cellule, cette immunoglobuline peut être soit exprimée à la surface de la cellule, soit sécrétée. Dans le premier cas on parle d'**immunoglobuline de surface** ou de membrane (sIg). Dans le second on l'appelle **anticorps**.*

*Chez l'homme, les lymphocytes B représentent à peu près **5 à 15 %** des lymphocytes sanguins, soit **200 à 400/mm^3.** Pour la majorité ils expriment deux isotypes d'immunoglobulines, IgM et IgD, porteurs de la même spécificité anticorps (même paratope, donc même idiotype). Les lymphocytes B porteurs d'immunoglobulines de membranes d'autres isotypes (IgG, IgA et IgE) sont beaucoup moins fréquents. Cependant certains tissus sont particulièrement riches en certains de ces lymphocytes ; c'est le cas des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, enrichis en lymphocytes B à IgA de surface.*

A la naissance le répertoire B est quasiment établi. Les anticorps préexistent, indépendamment de toute stimulation antigénique : l'antigène ne fait qu'amplifier la production d'anticorps spécifiques lui correspondant. Dans l'organe lymphoïde primaire qui gouverne la lymphopoïèse B, la différenciation qui conduit à des lymphocytes B matures naïfs procède en deux étapes: la première mène du progéniteur au lymphocyte B porteur d'un **BCR** (récepteur du lymphocyte B ou "B cell receptor") unique. La seconde élimine parmi ces lymphocytes ceux qui sont **auto-réactifs**. Cet organe lymphoïde est clairement individualisé chez les oiseaux: il s'agit de la **bourse de FABRICIUS**. Chez les mammifères la **moelle osseuse hématopoïétique** remplit ce rôle. Tout au long de l'existence l'organe lymphoïde primaire renouvelle quotidiennement la population des lymphocytes B naïfs. Cette capacité de renouvellement décline progressivement avec l'âge.

La première étape de la différenciation produit un lymphocyte B qui exprime une immunoglobuline de surface de spécificité unique (idiotypie). Les étapes de la différenciation du lymphocyte B suivent celles des réarrangements des gènes des immunoglobulines qui conduisent à une immunoglobuline opérationnelle. L'obtention du produit fonctionnel d'un réarrangement est le signal pour passer à l'étape suivante. L'obtention d'une immunoglobuline de surface est un point crucial dans le développement du lymphocyte B, puisqu'elle lui permet de reconnaître son antigène et, ainsi, d'être activé par ce dernier. Elle est le pré-requis indispensable à la deuxième étape: la reconnaissance des antigènes du soi qui conduit à l'élimination des clones B auto-réactifs, et à l'établissement de la **tolérance**.

II - LES ORGANES LYMPHOÏDES PRIMAIRES B

Nous rappellerons que les organes lymphoïdes centraux ou **primaires** sont le site de **différenciation** et de **maturation** des lymphocytes. Le développement de ces derniers est **totalement indépendant de la présence des antigènes** et est sous le contrôle de l'activité inductrice du réticulum d'origine épithéliale. Ces organes sont le siège d'une intense activité mitotique favorisant les réarrangements géniques indispensables à la création des glycoprotéines de membrane reconnaissant spécifiquement l'antigène: les immunoglobulines de surface et le TCR. Seuls les lymphocytes porteurs d'un réarrangement fonctionnel émigreront hors de ces organes, qui sont donc le lieu d'**acquisition du répertoire antigénique**, mais aussi d'**apprentissage de la tolérance au soi.**

Pour la lignée B, les organes lymphoïdes primaires sont la **moelle osseuse** chez les mammifères, ou la **bourse de Fabricius** chez les oiseaux. Ils ont été étudiés dans le cours sur les organes de l'immunité.

III LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES B

Le microenvironnement de la moelle osseuse est indispensable au bon déroulement de la lymphopoïèse B. La lignée B dérive probablement d'un précurseur lymphoïde commun unique d'où divergent les lymphocytes T et B, les cellules NK et les cellules folliculaires dendritiques qui ont un rôle fondamental dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Cette origine commune a été prouvée chez la souris par l'inactivation d'un gène particulier, le gène Ikaros.

On individualise quatre stades qui conduisent le précurseur B au lymphocyte B mature: successivement il passe par les stades de lymphocyte **pro-B précoce**, lymphocyte **pro-B tardif**, puis lymphocyte **pré-B** et enfin lymphocyte **B immature**. Cette progression se fait au contact des **cellules stromales** qui fournissent les informations nécessaires à cette progression, d'abord par **contact cellulaire direct** aux stades précoces, puis par l'intermédiaire de **médiateurs solubles** aux stades tardifs.

III-1-Contact initial cellule stromale/précurseur B

La première étape conduit le précurseur B, qui est porteur du CD34, et qui n'a encore **aucun réarrangement** de ses gènes des immunoglobulines au stade de lymphocyte **pro-B précoce**. Le contact initial entre la cellule stromale et le précurseur B fait intervenir diverses molécules d'adhérence. Citons

- l'intégrine **VLA-4** (very late antigen 4, ou CD49d)

exprimée à la surface des précurseurs, qui interagit avec son ligand VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1, ou CD106) sur les cellules stromales ;

- une molécule, **CD44**,

*qui est impliquée non seulement dans la lymphopoïèse B, mais aussi dans la recirculation des lymphocytes et dans la survenue des métastases des cancers. Elle reconnaît sur la cellule stromale l'**acide hyaluronique**. Cette liaison CD44-acide hyaluronique n'a pas de fonction de signal direct et facilite juste le contact spécifique qui s'établit entre la cellule stromale et le précurseur B.*

Celui-ci repose sur la liaison de plusieurs protéines exprimées à la surface des deux types cellulaires:

- le **SCF** (pour "**stem cell factor**" ou facteur des cellules souches) sur la cellule stromale et la molécule ***c-kit***, à la surface du lymphocyte B, qui appartient avec

d'autres récepteurs de cytokines (interleukine-1[IL-1]-R, Colony Stimulating Factor[CSF]-1-R) à la superfamille des immunoglobulines.

*La molécule c-kit a une activité tyrosine kinase qui est activée par la liaison du SCF et qui entraîne, d'une part une prolifération du lymphocyte pro-B précoce, et d'autre part l'apparition à la surface du lymphocyte pro-B d'un récepteur spécifique d'un facteur de croissance et de différenciation sécrété par la cellule stromale, l'**interleukine-7 (IL-7)**. Contrairement à la lignée T, le SCF ne serait pas essentiel à la lymphopoïèse B.*

- Depuis peu on a isolé d'autres facteurs tels que la chimiokine **SDF-1** (stem cell derived factor 1 ou CXCL 12) et son ligand **CXC-R4** exprimé sur le précurseur B.
- **L'IL-7** intervient au stade de lymphocytes pro-B tardif et pré-B, qui expriment le récepteur spécifique de cette cytokine. Elle remplit à la fois un rôle de facteur de croissance, de protection vis-à-vis de l'apoptose et d'accessibilité de l'ADN aux recombinases.

III-2-Les quatre stades de différenciation

Chaque stade de différenciation du lymphocyte B est marqué par une étape de réarrangement des gènes des immunoglobulines, d'abord de la chaîne lourde µ, puis des chaînes légères 1 puis 1.

L'obtention d'un réarrangement **D-J** fonctionnel est la signature du lymphocyte **pro-B précoce**. Au stade de lymphocyte pro-B précoce, la cellule exprime différents marqueurs : CD45R, une des isoformes de CD45 (voir V-1-4-2), les antigènes du CMH de classe II, CD19, CD40 et CD38.

Celui d'un réarrangement **V-DJ** fonctionnel est celle du stade **pro-B tardif**. Le récepteur de l'IL-7 apparaît à ce stade.

L'obtention d'une **chaîne lourde µ** est l'étape suivante et la marque du stade **pré-B**: classiquement ces cellules étaient définies comme n'ayant que des chaînes lourdes µ intra-cytoplasmiques détectées par immunofluorescence directe. L'amélioration de la sensibilité des techniques de détection, avec notamment les méthodes d'immunoprécipitaion membranaire, a permis de retrouver la chaîne lourde µ exprimée à la surface du lymphocyte pré-B, associé à un **équivalent de chaîne légère** (cf III-5). A ce stade apparaît la molécule CD20.

Le stade de lymphocyte **B immature** est marqué par l'obtention d'un réarrangement fonctionnel d'une des deux chaînes légères et l'expression à la surface d'une **IgM** monomère. C'est à ce stade qu'apparaît la molécule CD21.

Enfin, le lymphocyte **B mature** voit son expression membranaire d'IgM diminué au profit de celle de l'IgD, par épissage alternatif d'un mARN commun (cours sur les immunoglobulines, IX.3.3.7). Il exprime donc deux isotypes différents, cependant porteur de la même spécificité idiotypique (même VDJ).

Nous avons vu que les réarrangements se font dans un **ordre** précis: d'abord sur la chaîne lourde µ, D-J, puis V-DJ, ensuite sur les chaînes légères avec d'abord V1-J1 puis V1-J1 en cas d'échec du précédent. Pour les gènes VH la probabilité d'obtenir un réarrangement fonctionnel n'est que d'un tiers. En cas de réarrangements non fonctionnels sur les deux allèles, le lymphocyte B meurt.

Le développement du lymphocyte B dépend de la production séquentielle de réarrangements fonctionnels successifs sur les gènes des chaînes lourdes puis légères des immunoglobulines.

Au stade de lymphocyte pro-B tardif, si le lymphocyte échoue dans ses tentatives sur les deux chromosomes 14 pour obtenir un réarrangement V-DJ fonctionnel, il ne peut passer au stade suivant de

lymphocyte pré-B et meurt, car il a alors délété l'ensemble de ses gènes D. Ceci survient pour environ 45 % des lymphocytes pro-B tardifs.

Au stade pré-B, avant que le lymphocyte ne commence à réarranger ses gènes des chaînes légères, il subit plusieurs cycles de division cellulaire qui permettent d'augmenter le nombre de progéniteurs avec un VDJ donné qui pourront donner naissance à des descendants avec différents réarrangements des gènes des chaînes légères. Ceci accroît donc la diversité des anticorps.

Les gènes des chaînes légères offrent plus de possibilités de sauvetage en cas de première tentative de réarrangement infructueuse, en raison de leur nombre (deux types, 1 *et* 1*) et de leur organisation. Pour les chaînes légères* 1 *et* 1*, l'existence de nombreux gènes V et de plusieurs gènes J autorise plusieurs essais sur un même chromosome. Ceci explique le fait qu'en principe la quasi totalité (95 %) des lymphocytes qui atteint le stade pré-B finit par avoir une chaîne légère fonctionnelle.*

Le lymphocyte B est donc soumis à différents points de contrôle ("chek-points") au cours de son développemnt. Cela a été mis en évidence dans des modèles murins de souris KO pour différentes molécules :

- facteurs de transcription au stade pro-B précoce (E2A, EBF, pax 5)
- transition pro-B/pré-B bloqué en cas de déficit en RAG, IL-7Rα, c-kit, CD79a et b, ou en facteur anti-apoptotique bcl-XL.

III-3- Marqueurs phénotypiques de différenciation

A côté des réarrangements des gènes des immunoglobulines, qui définissent les quatre stades de différenciation du lymphocyte B, il existe d'autres marqueurs qui permettent de caractériser (on dit aussi **phénotyper**) ces cellules et les lymphoprolifération malignes de nature B qui sont leurs contreparties pathologiques par arrêt à un stade donné de maturation et prolifération incontrôlée. Ce sont soit des molécules exprimées à la surface du lymphocyte B, soit des enzymes ou d'autres protéines intracellulaires.

Les **marqueurs de différenciation membranaire** peuvent être exprimés à tous les stades de la lignée et, lorsqu'ils ne sont uniquement retrouvés que sur des éléments de la lignée lymphocytaire B on parle de marqueur **pan-B**. C'est le cas de la molécule **CD19** à la différence de la molécule CD45, également exprimé du progéniteur au lymphocyte B immature, mais aussi retrouvée sur d'autres cellules que les lymphocytes B, telles que les lymphocytes T. D'autres marqueurs ne sont exprimés qu'aux stades **précoces**: le **CD10** uniquement sur les progéniteurs, le **CD38** du stade de progéniteur à celui de pro-B tardif. Le CD10 est une endopeptidase encore appelée CALLA (common acute lymphoblastic leukemia antigen), car initialement décrit sur des cellules de leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant. Il est également retrouvé sur les thymocytes précoces. D'autres apparaissent plus **tardivement**, comme le **CD20** à partir du stade pré-B, le **CD21** à partir du stade de lymphocyte B immature. Enfin le **CD40** et les antigènes **HLA de classe II** apparaissent dès le stade de pro-B précoce et persistent tout au long du développement de la lignée.

*Les **enzymes** et les **protéines intracellulaires** sont impliquées dans les processus de recombinaison. Les recombinases **RAG-1** et **RAG-2** sont exprimées jusqu'à la fin du stade pré-B, tant que le lymphocyte réarrange ses gènes d'immunoglobulines. Les **facteurs de transcription Oct-2** et **E12**, impliqués dans la transcription des gènes des chaînes lourdes sont exprimés depuis le stade de pro-B précoce à celui de B immature, alors que **NF-**1**B**, facteur de transcription des gènes de chaîne légère, est exprimé plus tardivement à partir du stade pré-B. La terminal déoxynucléotidyl transférase (**TdT**), dont nous avons mentionné le rôle dans l'obtention de la diversité jonctionnelle de type N, n'est exprimée que jusqu'au stade de lymphocyte pro-B tardif, expliquant l'exclusivité des chaînes lourdes pour ce phénomène.*

Enfin nous allons voir (cf III-5-) que le produit de deux gènes, 1**5** et **V pré-B**, ne sont retrouvés qu'au stade **pré-B**.

III-4- Contrôle des réarrangements

*Nous rappellerons (voir cours sur les immunoglobulines, X-3-3-9) que des protéines régulatrices spécifiques contrôlent l'**état d'ouverture de la chromatine** qui commande l'accessibilité des régions promotrices et "enhancer" aux recombinases. L'existence de protéines régulatrices spécifiques selon la nature T ou B du lymphocyte explique que l'absence de réarrangement des gènes du TCR soit la règle dans les lymphocytes B, et vice versa malgré la nature vraisemblablement identique des recombinases des deux types de cellules.*

*De plus les réarrangements rapprochent le promoteur situé en amont (5') du gène V de l'"enhancer" situé dans l'intron J-C et de ceux situés en aval (3') du gène C: il en résulte une augmentation de la transcription. Donc, outre la génération de la diversité, les réarrangements géniques participent à la **régulation de l'expression** des gènes des immunoglobulines.*

III-5- Produits des gènes 15 et V pré-B

L'expression à la surface du produit d'un réarrangement fonctionnel, à partir du stade pré-B, est la condition pour faire cesser toute tentative de réarrangement sur le locus en cause et passer à l'étape suivante.

Ceci est parfaitement illustré chez la souris par l'introduction, dans le génome en configuration germinale, de transgène réarrangé soit de gènes de chaînes lourdes, soit de gènes de chaînes légères. Dans le premier cas les souris ont des immunoglobulines qui toutes possèdent la chaîne lourde transgénique, alors que les chaînes légères sont d'origine endogène. Dans la deuxième hypothèse on ne retrouve que des chaînes légères transgéniques dans les immunoglobulines produites.

Pour qu'au stade pré-B ce mécanisme soit opérationnel, il faut que la chaîne μ, qui ne peut être exprimée seule à la membrane, le soit en association avec un équivalent de chaîne légère qui n'est pas encore synthétisée à ce stade. C'est le rôle de deux protéines, 1**5** et **V pré-B**, de s'associer pour pallier à cette carence.

La première, 1**5**, présente une homologie de structure avec un domaine constant C1 : elle s'associe par une liaison covalente au premier domaine constant de la chaîne μ. La seconde, **V pré-B**, ressemble à un domaine variable additionné d'un court segment N-terminal. Leur association forme un équivalent de chaîne légère, **invariant** à la différence des chaînes 1 et 1. Elle permet l'expression à la membrane de la chaîne μ, en compagnie des molécules CD79a et CD79b. La signalisation, via ce récepteur par un ligand inconnu à ce jour, entraîne une intense prolifération des lymphocytes pré-B, l'arrêt des tentatives de réarrangement sur le locus des chaînes lourdes et le début de celles sur celui des chaînes légères.

Il esiste donc deux vagues d'expression des gènes RAG1 et RAG2, correspondant successivement aux recombinaisons des gènes de la chaîne lourde, puis de la chaîne légère. Entre leur activité est indétectable, suite à la signalisation par le pré-BCR.

L'obtention d'une chaîne légère conduit au remplacement de la chaîne 15-V pré-B par cette dernière, ce qui donne une IgM. La signalisation via l'IgM ou l'arrêt de celle via le complexe $(\mu\text{-15-V pré-B})_2$ marquent l'arrêt des réarrangements sur les gènes des chaînes légères.

III-6- Exclusion allèlique

Ce processus séquentiel de réarrangements explique la **monospécificité** du lymphocyte B et son corollaire, l'**exclusion allèlique**: il est en effet aisé de comprendre qu'un seul locus parental sur le chromosome 14 pour les chaînes lourdes soit exprimé. L'autre est

soit le siège d'un réarrangement abortif en cas d'échec sur le premier et de succès sur le second, soit en configuration germinale si la première tentative a été la bonne. Pour les chaînes légères le même phénomène est observé, mais avec deux loci: réarrangement d'abord sur le chromosome 2 (locus 1) puis, en cas d'échec, sur le chromosome 22 (locus 1): chaque fois que le gène 1 est exprimé les deux loci 1 sont porteurs de deux réarrangements abortifs.

IV- SELECTION DES LYMPHOCYTES B

IV-1- Tolérance B

La phase finale de différenciation du lymphocyte B immature, qui vient d'exprimer une IgM à sa membrane, comporte, avant la sortie de la moelle osseuse, deux dernières étapes. La première consiste en un **épissage alternatif** du transcrit primaire de la chaîne lourde qui donne soit une **chaîne μ**, soit une **chaîne** 1, permettant l'expression simultanée d'IgM et d'IgD de surface qui caractérise les lymphocytes B matures naïfs (cf cours *Immunoglobulines,* IX-3-3-7).

La deuxième étape est l'élimination des lymphocytes B immatures dont l'IgM peut lier les antigènes du soi multivalents, exprimés dans la moelle osseuse. Expérimentalement dans des modèles de souris transgéniques pour des chaînes μ et 1 spécifiques soit d'antigène du soi, soit d'antigène exogène, il a été montré que le pontage des IgM membranaires du lymphocyte B immature reproduisait l'effet des antigènes multivalents en provoquant soit la mort, soit l'inactivation du lymphocyte B.

Lorsque l'antigène du soi est exprimé à la surface d'une cellule sa liaison à l'IgM de surface entraîne l'**apoptose** du lymphocyte B, et donc la délétion clonale. En cas d'antigène du soi soluble la liaison entraîne une inactivation, encore appelée **anergie**, du lymphocyte B. Ces deux phénomènes participent à l'établissement de la **tolérance B centrale**. Seuls les lymphocytes B dont l'IgM n'est pas capable de se lier à un ligand dans la moelle osseuse vont exprimer conjointement une IgD de même spécificité anticorps et vont pouvoir quitter la moelle osseuse.

Pour les antigènes du soi non exprimés dans la moelle osseuse, nous verrons ultérieurement (cf V-1-) que l'absence de lymphocytes T auxiliaires rend compte de l'établissement de la tolérance B périphérique.

Les lymphocytes B auto-réactifs peuvent cependant être sauvés de la mort par apoptose par le phénomène de **"receptor editing"** qui est la conséquence du maintien de l'activité recombinase après l'obtention d'une première chaîne légère. Si son association avec la chaîne lourde confère au BCR une auto-réactivité, la chaîne lourde peut se dissocier de ce premier partenaire, se réassocier transitoirement avec la pseudo-chaîne légère, en attendant la synthèse d'une deuxième chaîne légère qui sera acceptée si elle ne confère pas de spécificité auto-immune.

IV-2- Production médullaire

La production médullaire de lymphocytes B est continuelle avec un renouvellement quotidien. Chez la souris on estime cette production journalière entre 30 et 50.10^6 lymphocytes avec autant de cellules qui disparaissent par jour. La moitié du stock des lymphocytes B matures a une ***courte durée de vie****, alors que l'autre a une* ***durée de vie longue*** *et est principalement constituée de lymphocytes B mémoire. Ce renouvellement quotidien assure la couverture de l'intégralité du répertoire immunologique de l'individu qui permet de faire face à une rencontre avec un antigène inconnu pendant que la persistance des lymphocytes B mémoire permet d'être prêt à répondre rapidement à une restimulation antigénique.*

IV-3- Les lymphocytes B $CD5^+$

Une sous-population particulière de lymphocytes B ne suit pas scrupuleusement le schéma de différenciation décrit ci-dessus. Elle se caractérise par l'expression d'un marqueur membranaire, la molécule **CD5**, normalement retrouvé sur le lymphocyte T, et par la quasi absence d'expression simultanée d'IgD avec l'IgM en surface. La molécule CD5 se lie à une autre protéine exprimée à la surface du lymphocyte B, la molécule **CD72**. La liaison de ces deux molécules facilitent les contacts entre lymphocytes T et B, et dans le cas de l'expression du CD5 par le lymphocyte B permettrait des contacts homotypiques B-B de signification inconnue.

Les caractéristiques de cette sous-population particulière de lymphocytes B sont les suivantes. Ils apparaissent **précocement** dans l'ontogénie; ils prédominent dans le sang du cordon, mais ne représentent plus qu'un faible pourcentage dans le sang de l'adulte. Contrairement aux lymphocytes B conventionnels, qui sont constamment renouvelés par la moelle osseuse, ces lymphocytes B $CD5^+$ sont doués de la capacité d'**auto-renouvellement**. Leur production d'immunoglobulines est élevée, principalement de classe **IgM**, avec une **faible affinité** et une reconnaissance prédominante d'antigènes de nature **polysaccharidique**.

*Sur le plan génétique, les gènes variables VH utilisés sont les plus proches des gènes D, vraisemblablement parce que ces gènes sont les premiers à être accessibles aux recombinases au cours de l'ontogénie. De même, parce que la TdT n'est pas active aux stades initiaux de l'ontogénie, les réarrangements géniques des chaînes lourdes des immunoglobulines de ces lymphocytes B $CD5^+$ ne s'accompagnent pas d'une diversité N marquée. Le phénomène d'hypermutations somatiques (cf V-4) est peu marqué dans cette lignée. Les anticorps produits par les lymphocytes B $CD5^+$ sont souvent **polyspécifiques**, capables de reconnaître plusieurs ligands, qui sont de préférence des **auto-antigènes** solubles. Enfin cette sous-population de lymphocytes B présente un tropisme sélectif pour les **épithéliums**.*

Cette population de lymphocytes B $CD5^+$ représente donc une population ancestrale pour beaucoup comparable aux lymphocytes T à TCR 11. Comme eux, ayant un répertoire peu diversifié vis-à-vis d'épitopes partagés par de nombreux micro-organismes, les lymphocytes B $CD5^+$représenterait une première ligne de défense. On retrouve ce marqueur à la surface des lymphocytes B de 90 % des cas de **leucémie lymphoïde chronique**, prolifération maligne de petits lymphocytes matures.

V- LA PRODUCTION DES ANTICORPS

De nombreuses bactéries se multiplient dans le milieu extra-cellulaire. Pour les germes à développement intracellulaire obligatoire, la dissémination implique un court passage par le milieu extra-cellulaire pour passer d'une cellule à une autre. Donc potentiellement tout germe , à un moment ou à un autre de son cycle de reproduction, peut être la cible des anticorps qui sont le support de l'immunité humorale.

Ces derniers, produits des lymphocytes B, visent à détruire les germes extra-cellulaires et à empêcher la dissémination des germes intracellulaires par trois mécanismes:

- la **neutralisation** qui empêche la liaison du pathogène aux cellules, première étape indispensable de l'infectiosité:
- l'**opsonisation**, qui facilite la phagocytose, soit directement par liaison spécifique aux récepteurs des Fc des immunoglobulines , soit indirectement après dépôt du complément activé par le complexe immun antigène-anticorps de bon isotype;
- l'**activation du complément** qui soit conduit à la lyse des micro-organismes par le complexe d'attaque membranaire, soit participe à l'apparition de la réponse inflammatoire.

Pour la plupart des antigènes, qui sont dits **thymodépendants**, les lymphocytes B nécessitent la collaboration d'une sous-population particulière de lymphocytes T, les

lymphocytes **T CD4$^+$Th2**, pour développer une réponse humorale: l'aide des lymphocytes T est indispensable pour la **commutation isotypique** (ou "switch") et pour la **maturation d'affinité** des anticorps.

V-1- LE BCR

A la surface du lymphocyte B, la sIg est associée à des molécules co-réceptrices pour former le complexe BCR dont la fonction est double:

- **signalisation**, conduisant, selon le stade de différenciation du lymphocyte B et les informations du micro-environnement, soit à la **prolifération** du lymphocyte B, soit à son **anergie**, soit à l'induction de sa mort par **apoptose**
- **internalisation** de l'antigène suivi de son apprêtement et de la présentation de peptides antigéniques par les molécules HLA de classe II, permettant la coopération B-T, indispensable à l'induction de la réponse immunitaire vis-à-vis de la majorité des antigènes.

Ce deuxième rôle confère au lymphocyte B le statut de **CPA** indispensable pour requérir l'aide des lymphocytes T CD4$^+$Th2 nécessaire à la prolifération, l'expansion clonale et la différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en lymphocytes B mémoire. Pour un petit nombre d'antigènes, dits **thymoindépendants**, l'aide apportée usuellement par les lymphocytes T, est directement fournie par l'antigène bactérien.

V-1-1- L'immunoglobuline de membrane

Les sIg appartiennent aux divers isotypes d'Ig, mais sont principalement de classe **IgM et IgD.** La majorité des lymphocytes B circulants, qui représentent **10 %** des lymphocytes sanguins, co-expriment ces deux isotypes qui partagent alors le **même paratope**, donc les **mêmes idiotypes** et la **même spécificité anticorps**. Les deux chaînes lourdes sont produites par l'épissage alternatif d'un long transcrit primaire. Les lymphocytes B porteurs d'une IgM seule, sans IgD, sont soit des lymphocytes B immatures, soit des cellules stimulées, la perte de l'IgD de membrane étant un événement précoce de l'activation. Les lymphocytes B "commutés", exprimant une Ig d'un autre isotype que l'IgM ou l'IgD, pourraient être des cellules mémoire. Elles ne représentent qu'un faible contingent des lymphocytes sanguins (respectivement environ 0,3 et 0,1 % pour les lymphocytes à IgG et IgA de membrane). L'hypothèse selon laquelle les lymphocytes n'exprimant que l'IgM sont plus facilement tolérisables n'a pas reçu à ce jour de confirmation expérimentale. Bien au contraire l'étude des souris "knock-out" (génétiquement invalidée) pour le gène de l'IgD n'a retrouvée que des anomalies très minimes et un développement normal de la lignée B.

Les sIg diffèrent des Ig sécrétées par leur partie C-terminale (cf cours Immunoglobulines IX-3-3-9). L'extrémité hydrophile des Ig sécrétées y est remplacées par une région hydrophobe qui permet l'ancrage dans la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique. L'obtention de cette forme membranaire se fait par l'utilisation préférentielle d'un site de polyadénylation situé en 3' du ou des deux exons de membrane plutôt que de celui qui est situé en aval du dernier exon constant CH. De ce fait l'IgM de membrane est nécessairement monomère, puisque lui fait défaut l'octodécapeptide indispensable à sa polymérisation grâce à l'avant-dernière cystéine.

Cependant, et bien que les régions transmembranaire et cytoplasmique des sIg soient indispensables aux fonctions du BCR, la longueur de cette dernière, quel que soit l'isotype, est trop courte pour transmettre quelle qu'information que se soit. Les portions intracytoplasmiques sont respectivement de 3 acides aminés pour les chaînes lourdes μ et 1, 14 pour les chaînes 9 et 28 pour les chaînes 1 et 1.

V-1-2- Les molécules Ig9 et Ig9

Par sa portion intra-cytoplasmique, l'immunoglobuline de membrane est associée de manière **non-covalente** à **un hétérodimère**, constitué de deux chaînes **Ig**9 et **Ig** 9, que codent respectivement les **gènes mb-1** et **b29,** et que reconnaissent les anticorps des **CD79a** et **CD79b**. Ces chaînes associées au BCR appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, et présentent plus particulièrement une homologie avec certaines chaînes du complexe CD3 qui remplit les mêmes fonctions vis-à-vis du TCR (récepteur T de l'antigène). Leur portion intra-cytoplasmique est longue respectivement de 61 et 48 acides aminés et possèdent des séquences **ITAM** (pour "***I***mmunoreceptor ***T***yrosine based ***A***ctivation ***M***otif"), indispensables à la liaison de différentes protéines kinases capables d'enclencher des voies de signalisation différentes (voir cours sur *"immunorécepteurs*").

Une séquence propre à CD79a lui permet de fixer sur son motif ITAM non phosphorylé des kinases de la famille src ($p56^{lck}$, $p59^{fyn}$, $p55^{blk}$, $p53/56^{lyn}$), qui seraient ainsi rapidement mobilisables. La courte portion intra-cytoplasmique des sIg semble liée à des protéines du cytosquelette et induirait, après liaison au ligand exogène (l'antigène) une modification de l'hétérodimère CD79 résultant en une phosphorylation des motifs ITAM puis une activation des kinases.

V-1-3- Les voies de signalisation

La signalisation, c'est-à-dire la transmission de l'activation, commence par l'agrégation du BCR par l'antigène multivalent, et leur concentration dans les microdomaines.

Les ITAM sont retrouvés dans les sous-unités de signalisation des trois types de récepteur d'antigène : directs (BCR sur Ig9 et Ig9, chaînes CD31, 1, 1 et 1 du TCR) et indirect (chaînes 9 et 1 des FcR).

Les ITAM se définissent par l'existence d'une séquence d'acides aminés contenant deux fois une tyrosine séparée d'une leucine par deux résidus variables (YxxLxxxxxxxYxxL). Les tyrosines sont les substrats des kinases dont la fonction est de phosphoryler des résidus tyrosine.

La protéine kinase (PTK) **syk** est associée à la portion intra-cytoplasmique de la sIg alors que les PTK **lyn**, **fyn** et **blk** se lie à Ig9. La PTK déficiente dans l'agammaglobulinémie liée au sexe (ou maladie de BRUTON), appelée **btk** (pour "Bruton tyrosine kinase"), est également une des premières phosphorylées après stimulation du BCR.

L'engagement du BCR conduit à la phosphorylation de nombreuses protéines et résultent en l'activation d'au moins trois voies de signalisation:

- l'activation de la voie de la **phospholipase C**1 (PLC1, et plus particulièrement les formes 11 e 12, qui génère l'inositol tri-phosphate (IP3) et le diacylglyérol (DAG) entraînant l'augmentation du calcium intra-cytosolique et l'activation de la protéine kinase C (PKC).

- l'activation du proto-oncogène **ras**, lié aux protéines G, et par là, à la cascade des MAPkinases ("*M*itogen *A*ctivated *P*rotein")

- l'activation de la phosphatidyl inositol triphosphate kinase (**PI3-k)** et sa voie de signalisation (PKC1) et ses effecteurs, incluant NF-1B

V-1-4- Les autres constituants du BCR

Outre les molécules CD79a et CD79b, d'autres glycoprotéines de membrane sont associées à la sIg pour former le BCR. Il s'agit des molécules **CD22** et **CD45**.

V-1-4-1- La molécule CD22

Il s'agit d'une molécule d'**adhérence** qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, comportant 5 à 7 domaines Ig-like dans sa portion extra-cellulaire, selon ses isoformes. Elle co-précipite avec la sIg, faisant donc partie intégrante du BCR et est exprimée parallèlement à la sIg tout au long de la différenciation de la cellule B. CD22 est un **marqueur B spécifique.**

CD 22 est une molécule d'adhérence qui reconnaît sur les monocytes, les globules rouges et probablement sur les lymphocytes T des oligosides N-liés de structure acide sialique 92-6 galactose 91-4N Acétylglucosamine ou CD75, mais aussi au CD45. Sa portion intra-cytoplasmique est longue de 118 acides aminés. La phosphorylation du CD22 sur un motif ITIM (cf infra, V-1-5-2) recrute une phosphatase (SHP-1) et aboutit à une inhibition du lymphocyte B. La signalisation via le CD22 est cependant certainement plus complexe, puisque la portion intra-cytoplasmique de cette molécule possède aussi des motifs ITAM, capables de délivrer des signaux d'effet opposé aux précédents.

V-1-4-2- La molécule CD45

A l'opposé, la tyrosine phosphatase reconnue par les anticorps du cluster CD45, est retrouvée sur tous les lymphocytes. Sur le lymphocytes B elle est associée au BCR, et interviendrait en déphosphorylant Ig9 et Ig9. Le CD45 existe sous différentes isoformes qui diffèrent au niveau de leur partie extra-cellulaire, mais sont identiques pour leur portion intra-cytoplasmique. Cette dernière a une activité **tyrosine phosphatase**.

V-1-5- Les co-récepteurs

A côté des constituants propres du BCR, existent, physiquement associées à ce dernier, des molécules capables de moduler les effets de la stimulation de celui-ci par son antigène. Il s'agit du complexe **CD19/CD21/CD81**(ou **TAPA-1** pour "Target of anti-proliferative antibodies-1") et du **CD32** (ou récepteur **Fc**1**RII**).

V-1-5-1 Le complexe CD19/CD21/CD81

Il associe un récepteur **CD21** pour une fraction du 3e composant du complément (C3dg) capable aussi d'interagir avec la molécule CD23 exprimée sur les cellules folliculaires dendritiques présentant l'antigène, une molécule TAPA 1 (**CD81**), appartenant à la famille des serpentines avec sept domaines transmembranaires et la molécule **CD19** qui appartient à la superfamille des Ig et est capable d'activer la tyrosine kinase lyn.

La molécule CD19, glycoprotéine transmembranaire de 95 kD, possède une longue portion intra-cytoplasmique de 243 acides aminés et remplit deux fonctions:

- elle abaisse le seuil de sensibilité du BCR à l'antigène par un facteur 100. Ceci est particulièrement important au début de la réponse anticorps quand le BCR a encore une faible affinité pour l'antigène

- elle favorise la stimulation du lymphocyte B par le lymphocyte T, via l'interaction CD40-CD40L, jouant ainsi un rôle d'inhibition de l'apoptose qu'entraîne la seule stimulation par l'antigène du BCR.

Le ligand du CD19 serait la molécule CD77, globo-triaosylcéramide, également présent sur le lymphocyte B.

Le CD81, également désigné sous le nom de TAPA1 (Target anti-proliferative antibody 1) est un peptide non glycosylé de 26 kD, associé à la molécule Leu 13 de 16 kD. Toutes les deux seraient impliquées dans des interactions cellulaires homotypiques.

La molécule CD21 est capable de fixer le C3d, et son expression sur le lymphocyte B expliquerait en partie le rôle du complément dans l'induction de la réponse immunitaire humorale. Des complexes immuns (CI) porteurs de C3d peuvent se fixer au CR2 des cellules folliculaires dendritiques, et être ainsi correctement et

longuement présentés, mais aussi au CR2 du lymphocyte B, entraînant une coligation du BCR et complexe CD19/CD21/CD81. Dans des modèles expérimentaux de complexes immuns lysozyme-anti-lysozyme, il a été montré que l'adjonction de 2 ou 3 molécules de C3d au CI multipliait l'immunogénicité de ce dernier par des facteurs 10^3 et 10^4 respectivement.

Le rôle principal de transduction du complexe est dévolu au CD19 qui, dans sa portion intra-cytoplasmique possède des motifs YxxM (tyrosine-x-x-méthionine) capable de fixer et d'activer la PI-3kinase.

V-1-5-2- La molécule CD32 ou récepteur Fc1RII

Le CD32 est un récepteur de faible affinité pour les IgG agrégées ou complexées avec leur antigène. Il existe sous trois isoformes : Fc1RIIA, Fc1RIIB et Fc1RIIC. Les lymphocytes B n'expriment que l'isoforme Fc1RIIB.

Quelle que soit l'isoforme le CD32, glycoprotéine transmembranaire, possède deux domaines de type Ig-like dans sa portion extra-cellulaire. Seule la portion intra-cytoplasmique différencie les isotypes B et C. La coligation du BCR et du CD32 par un complexe antigène-anticorps délivre un signal négatif au lymphocyte B. Une telle situation s'observe lorsque la réponse humorale a atteint son but, à savoir l'éradication de l'antigène et qu'il ne reste plus de molécules libres d'antigène. Il importe alors de signifier au lymphocyte B qu'il n'a plus à produire d'anticorps.

*Cette signalisation se fait grâce à des motifs **ITIM** (pour "**I**mmunoreceptor **T**yrosine based **I**nhibitory **M**otif") constitués par une simple séquence YxxL, qui aboutirait à l'inactivation des motifs ITAM des CD79a et b. Ces motifs ITIM lient une phosphatase (**SHP-1** pour "Src Homology (SH)2 domain phosphatase-1") dont l'activité finale, via le PIP3 (phosphatidyl inositol triphosphate) et l'IP4 (inositoltétraphosphate) est de bloquer l'entrée dans la cellule du calcium, et par voie de conséquence l'activation du lymphocyte B;*

L'ensemble de ces données montre la complexité du BCR et de ses voies de signalisation, l'existence de co-récepteurs pouvant exercer une régulation positive ou négative. On comprend donc que l'activation par le BCR du lymphocyte B puisse aboutir, en fonction du stade de différenciation de la cellule, c'est-à-dire des molécules de surface exprimées, et des informations délivrées par le micro-environnement (contacts cellulaires, cytokines) à des effets cellulaires aussi opposés que la prolifération cellulaire ou l'apotose.

V-2- La réponse aux antigènes thymodépendants

V-2-1- Le deuxième signal

Tout comme le lymphocyte T, le lymphocyte B mature naïf qui a quitté la moelle osseuse équipé d'un BCR opérationnel nécessite, pour son activation dans les organes lymphoïdes secondaires, la présence simultanée de **deux signaux**: le premier est fourni par l'**antigène**, le second, dans le cas des antigènes thymodépendants, par le lymphocyte **T CD4$^+$Th2**.

Le lymphocyte B n'est pas une cellule douée des capacités de phagocytose, contrairement au macrophage: il ne peut donc ingérer de gros micro-organismes de la taille des bactéries. Il peut néanmoins internaliser, après liaison par son BCR, des virus ou des protéines solubles. Nous rappellerons que l'épitope de l'antigène reconnu par l'immunoglobuline de surface, appelé **épitope B**, est le plus souvent un épitope **conformationnel**. Après internalisation et dégradation partielle de l'antigène, le lymphocyte B réexprime, présenté par l'antigène HLA de classe II, un peptide qui porte un **épitope T**, le plus souvent **séquentiel**. Le lymphocyte B sert alors de CPA à un lymphocyte T effecteur préalablement sensibilisé à ce même peptide par une CPA d'une autre origine (macrophage, cellule dendritique).

V-2-2- La tolérance périphérique

Cette double reconnaissance d'épitopes différents sur la même molécule d'antigène par les lymphocytes B et T a plusieurs conséquences: elle permet tout d'abord d'expliquer le maintien de la tolérance aux antigènes du soi. Vis-à-vis des antigènes protéiques du soi soluble, l'existence de lymphocytes B auto-réactifs n'est pas synonyme à tout coup de réponse auto-immune: encore faut-il qu'il existe un lymphocyte T auxiliaire capable de collaborer avec ce lymphocyte B, autrement dit capable de reconnaître le même auto-antigène. **La tolérance T assure la tolérance B**.

Il n'est pas rare cependant de voir, de façon transitoire, des auto-anticorps à faible titre au cours de l'intense stimulation polyclonale qui accompagne un syndrome infectieux. Cette réponse auto-immune s'explique par une réaction croisée entre des épitopes T de l'agent infectieux et du soi: les lymphocytes T spécifiques de l'agent infectieux sont alors capables d'aider les lymphocytes B auto-réactifs. Cette collaboration dure tant que persiste l'infection qui génère de tels lymphocytes T.

*Cette reconnaissance double est par ailleurs le support rationnel de **vaccins** vis-à-vis de certains germes. L'Haemophilus influenzae B , chez le très jeune enfant, peut être responsable de méningite grave. L'antigène vaccinal est un polysaccharide de la paroi qui est thymoindépendant, et, pour cette raison, le système immunitaire immature du jeune enfant y répond mal. L'artifice employé pour obtenir une réponse satisfaisante consiste à fusionner ce polysaccharide avec un antigène thymodépendant, la toxine tétanique, dont on sait qu'il entraîne une forte réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4$^+$Th2 spécifiques du tétanos vont être capables de fournir l'aide nécessaire aux lymphocytes B spécifiques de l'Haemophilus qui ont internalisé la protéine de fusion, via leur BCR, et présente un peptide de la toxine tétanique.*

V-2-3- L'aide des lymphocytesT CD4$^+$Th2

Le complexe peptide-CMH de classe II stimule une sous-population de lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes T CD4$^+$Th2. Ceux-ci, en retour, activent le lymphocyte B par l'intermédiaire de protéine de membrane et de cytokines sécrétées.

V-2-3-1- La molécule CD40

La première étape a lieu dans la région paracorticale du ganglion : le contact entre le lymphocyte T et le lymphocyte B se fait par une liaison entre deux protéines membranaires: la molécule **CD40L** à la surface du lymphocyte T et la molécule **CD40** exprimée par le lymphocyte B. La première appartient à la famille du TNF alors que la seconde appartient à celle des récepteurs du TNF. Elles sont donc tout à fait analogues au couple FasL-Fas qui permet la liaison du CTL CD8$^+$ à sa cible. Cette liaison provoque l'entrée du lymphocyte B, quiescent jusqu'alors, dans le cycle cellulaire. Dans un deuxième temps le lymphocyte T réorganise son cytosquelette pour focaliser au point de contact avec le lymphocyte B les cytokines qui vont être responsables de la **prolifération** et de la **commutation isotypique**.

Le CD40 est exprimé à la surface des lymphocytes B, mais aussi des cellules folliculaires dendritiques, des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules endothéliales et des progéniteurs hématopoïétiques. C'est un signal de co-stimulation indispensable pour les lymphocytes B : il intervient également dans la commutation isotypique, la sélection des thymocytes et l'induction de la tolérance périphérique.

Le CD40L, (ou gp39 ou CD154), est une protéine de membrane inductible à la surface des lymphocytes TCD4$^+$ et de certains lymphocytes TCD8$^+$ après activation. Il est essentiel à la coopération T-B.

Ce mode d'activation est donc tout à fait comparable dans sa mise en jeu à celui du macrophage par le lymphocyte T CD4$^+$Th1, mais ses effets en sont différents: l'aide du lymphocyte T CD4$^+$Th1 permet au macrophage de détruire le pathogène phagocyté, alors que

celle du lymphocyte T $CD4^+$Th2 entraîne une expansion clonale du lymphocyte B avant sa différenciation terminale en plasmocyte sécréteur d'anticorps ou en **lymphocyte B mémoire**. Ces effets différents sont le fruit de l'équipement spécifique en cytokines de chaque sous-population de lymphocyte T: **IL-4**, **IL-5**, **IL-6** et **IL-10** pour le lymphocyte T $CD4^+$Th2. L'**IL-4** est la cytokine qui après le contact lymphocyte T-lymphocyte B via le couple CD40L-CD40, provoque la **prolifération** et l'**expansion clonale**.

V-2-3-2- La commutation isotypique

L'activation du lymphocyte B entraîne la perte de la sIgD et la migration de la cellule vers un follicule primaire pour générer un **centre clair germinatif.**

La **commutation isotypique** permet d'associer à une même fonction anticorps (même VDJ) différentes propriétés effectrices (différentes classes d'immunoglobulines). Au cours d'une réponse immunitaire il est indispensable d'avoir des anticorps spécifiques d'un même antigène doués de propriétés effectrices différentes, conférant à certains la capacité d'activer le complément, à d'autres celle de franchir les muqueuses ou d'activer des cellules tueuses ("Natural Killer"), etc... Cette commutation isotypique nécessite l'aide du lymphocyte T $CD4^+$Th2: le lymphocyte B mature naïf exprime principalement de l'IgM et de l'IgD à sa surface. La réponse immunitaire est marquée par une commutation isotypique qui permet d'expliquer que dans le plasma l'isotype prédominant est l'IgG, alors que l'IgM ne représente que 10 % des immunoglobulines plasmatiques et que l'IgD n'est présente qu'en très faible quantité.

Cette commutation nécessite la liaison CD40L-CD40 entre le lymphocyte T et lymphocyte B, et est sous le contrôle des cytokines sécrétées par le lymphocyte T.

Il existe un très rare déficit immunitaire qui se traduit par une absence d'IgG et d'IgA dans le sérum des jeunes patients qui en sont affectés, associée à une importante élévation des IgM. Très rapidement, dès les descriptions initiales qui datent d'une vingtaine d'années, l'hypothèse d'un défaut de commutation comme cause de ce ***déficit avec hyper IgM*** *avait été avancée. On sait depuis peu que ce défaut de commutation est du à une absence de CD40L à la surface du lymphocyte T, qui est donc incapable de fournir son aide aux lymphocytes B.*

V-2-3-3- Les cytokines

Les cytokines agissent sur la chromatine en rendant accessible le site "switch" aux recombinases. Certaines entraînent la commutation d'une classe à une autre, alors que d'autres se contentent de soutenir la maturation finale d'un lymphocyte B déjà programmé pour la synthèse d'une classe donnée. Ainsi l'**IL-4** est la cytokine qui est indispensable à la commutation vers la classe **IgE** et le **TGF**9 ("Transforming Growth Factor 9") à celle vers l'**IgA**. L'IL-5, par contre, intervient chez l'homme dans la maturation finale des lymphocytes à IgA de surface. Si les mécanismes de la commutation sont en partie élucidés aujourd'hui, l'explication de l'équilibre plasmatique physiologique entre les isotypes demeure inconnue.

V-2-4- Le ganglion lymphatique

V-2-4-1- Architecture du ganglion lymphatique

Elle a été vue en détail dans le cours sur les organes de l'immunité.

V-2-4-2- Le centre clair germinatif du ganglion

Les lymphocytes B activés prolifèrent intensément dans le microenvironnemnt spécialisé du **centre clair germinatif** du ganglion. Il est impossible de reproduire *in vitro*, par simple co-culture de lymphocytes T et B, la **maturation d'affinité** des anticorps observée au cours d'une réponse immunitaire *in vivo*. Celle-ci nécessite le microenvironnement ganglionnaire. Elle est le propre des antigènes thymodépendants, et concerne plus les anticorps de classe IgG que ceux de classe IgM.

Après pénétration dans le parenchyme ganglionnaire le lymphocyte B, stimulé par le lymphocyte T dans la zone para-corticale, peut soit participer à la production immédiate d'IgM, soit migrer vers le follicule primaire. Là, par contact avec les **cellules folliculaires dendritiques**, il va subir une intense prolifération clonale ainsi qu'une maturation d'affinité de sa sIg. Les cellules folliculaires dendritiques ont une origine différentes des cellules dendritiques du thymus avec qui elles n'ont en commun que la forme étoilée, due à leurs ramifications ou dendrites. Elles sont capables de garder longtemps à leur surface les antigènes, sous forme de complexes immuns, grâce à différents types de récepteurs (du complément, pour le Fc des immunoglobulines), et ainsi de les présenter. Elles expriment aussi à leur surface la molécule **CD23** qui se lie au CD21 (ou récepteur CR2 du complément) du complexe CD21-CD19-TAPA-1 retrouvé à la membrane du lymphocyte B.

Le CD23 est le deuxième récepteur pour la portion constante des IgE (Fc1R II). Il s'agit d'un récepteur de faible affinité, qui est le seul des FcR à ne pas appartenir à la superfamille des immunoglobulines. Il fait partie de la superfamille des récepteurs de type lectine et peut être le ligand du deuxième récepteur du complément (CR2 ou CD21). Le CD23 est exprimé par les lymphocytes B, les macrophages activés et les cellules folliculaires dendritiques. Il peut être clivé, et sous forme soluble, être un témoin d'activation et agir comme facteur de co-stimulation des lymphocytes B.

V-2-4-3- Les centroblastes

Deux populations de lymphocytes B sont individualisés dans le centre clair germinatif: les **centroblastes** et les **centrocytes**. Leur distinction est un des critères de la classification des cancers du ganglion, appelés lymphomes.

Les **centroblastes** sont des cellules qui subissent un intense processus mitotique avec une division toutes les six heures environ. Ce sont de grandes cellules (blastes) à la chromatine fine et au cytoplasme abondant. Elles repoussent en périphérie les petits lymphocytes B quiescents qui forment le manteau. Cette intense **prolifération** augmente le nombre de lymphocytes B spécifiques de l'antigène stimulant. L'étude des réarrangements des gènes des immunoglobulines montre qu'un centre clair germinatif est le fruit d'un seul lymphocyte B fondateur et que la prolifération y est **clonale**.

La maturation d'affinité des anticorps observée au cours d'une réponse immunitaire peut être considérée comme un phénomène darwinien: il y a d'abord génération d'une très grande variabilité des BCR dans le centre clair germinatif, puis sélection, au contact des cellules folliculaires dendritiques, de ceux qui ont la plus forte affinité pour l'antigène.

La variabilité est le résultat des **hypermutations somatiques** qui intéressent les cellules en mitose, les centroblastes, retrouvées dans la **zone sombre** du centre germinatif.

Pour des raisons inconnues, le taux de mutations somatiques est considérablement plus élevé dans les régions variables réarrangées des gènes des immunoglobulines que partout ailleurs dans le génome: on note pas moins de 1 mutation pour 10^3 paires de bases (bp) par division alors que pour le reste du génome ce chiffre n'est que de 1 pour 10^{12} bp/division. Un rapide calcul prenant en compte la taille des régions variables (360 bp) et le fait que, statistiquement, trois mutations sur quatre entraînent un changement de l'acide aminé codé, montre que pratiquement chaque cellule fille est porteuse d'une mutation exprimée. L'apparition des mutations

est donc fonction des divisions, expliquant que l'intense activité mitotique des centroblastes fait le lit de la variabilté du BCR.

V-2-4-4- Les centrocytes

Les **centrocytes** sont les descendants des centroblastes. Ces petites cellules, qui ne se divisent plus, sont retrouvées dans la **zone claire** du centre germinatif au contact des cellules folliculaires dendritiques. Elles ont pour fonction de tester les différents BCR produits par les hypermutations somatiques au contact de l'antigène intact présenté par les cellules folliculaires dendritiques et de sélectionner ceux dont l'affinité pour l'antigène est forte. Le CD23 qu'elles expriment stabilise le contact avec le centrocyte via sa liaison au CD21 de ce dernier. La liaison entre un BCR de forte affinité et l'antigène induit la synthèse du produit du gène ***bcl-2***, qui prévient la survenue de l'**apoptose.** Seuls les centrocytes ayant une immunoglobuline de surface avec une forte affinité pour l'antigène survivent et sont capables de quitter le centre germinatif. Les autres, dont le paratope a perdu l'aptitude de se lier à l'antigène ou ne s'y lie plus que faiblement suite aux mutations, y meurent par mort cellulaire programmée. Il s'agit donc d'une **sélection positive en présence de l'antigène**.

V-2-4-5- Les lymphocytes B mémoire et les plasmocytes

Le devenir des centrocytes ainsi sélectionnés pour leur capacité à mieux fixer l'antigène est double: ils peuvent donner soit des plasmocytes, soit des lymphocytes B mémoire.

V-2-4-5-1- Les lymphocytes B mémoire

Si le centrocyte se lie, via le **CD40**, à un des rares lymphocytes T $CD4^{+}$Th2, exprimant le CD40L, que l'on retrouve éparses dans le centre germinatif, il se différencie en **lymphocyte B mémoire** à vie longue, qui supportera la réponse immunitaire anamnestique lors d'une rencontre ultérieure avec l'antigène.

V-2-4-5-2- Les plasmocytes

Le plasmocyte est la cellule spécialisée dans la synthèse et la sécrétion des anticorps. Elle provient de la différenciation terminale du lymphocyte B, six à sept mitoses après l'activation du lymphocyte B naïf.

Nous renvoyons au cours *"cellules de l'immunité"*pour sa description.

La différenciation ultime du lymphocyte B en **plasmocyte** fait intervenir la molécule **CD23**, sous sa forme membranaire exprimée à la surface des cellules folliculaires dendritiques et sous sa forme soluble. Cette molécule va interagir avec le récepteur CD21 (CR2) du complexe CD19/CD21/TAPA-1 du lymphocyte B.

Le plasmocyte n'exprime plus à sa surface ni immunoglobuline, ni antigène HLA de classe II. Il n'a donc plus de possibilité de contact avec l'antigène ou le lymphocyte T auxiliaire $CD4^{+}$Th2. Il ne peut donc que synthétiser et sécréter des anticorps, ceci pendant les deux semaines de sa durée de vie pour un plasmocyte à IgG ou IgA, de deux à trois jours pour ceux à IgM. N'ayant plus aucune possibilité de contrôle via le BCR ou le lymphocyte T, la réponse anticorps ne cesse qu'avec la disparition du plasmocyte producteur.

V-3- Les antigènes thymoindépendants

L'existence de déficits immunitaires sélectifs de la réponse immunitaire cellulaire (déficits T), entraînent, outre de gravissimes infections néo-natales à germes intracellulaires, une absence de réponse anticorps vis-à-vis de la majorité des antigènes, en raison du caractère indispensable de la coopération cellulaire T-B pour la réponse humorale. Il existe cependant un petit nombre d'antigènes, bactériens le plus souvent, capables de provoquer une réponse anticorps solide chez des sujets ayant un déficit T. Ces antigènes sont dits **thymoindépendants** et peuvent être des polysaccharides, des lipopolysaccharides (LPS) et des protéines polymériques.

Les deux types d'antigènes thymoindépendants (1 et 2) ont été décrits dans le cours sur l'antigénicité.

Nous rappellerons juste les caractéristiques de la réponse immunitaire aux antigènes thymoindépendants que nous avons déjà évoquées (cours sur les *Antigènes,* III-2): réponse de type **IgM**, de **faible affinité sans cellules mémoire**.

RESUME

Le lymphocyte B est la cellule qui supporte l'immunité humorale spécifique. Elle accomplit cette fonction par l'intermédiaire du récepteur spécifique pour l'antigène qu'elle exprime à sa membrane, l'immunoglobuline de surface (sIg). Un lymphocyte B n'exprime qu'une seule spécificité idiotypique (un site anticorps unique) qui peut être présent sur des isotypes différents. Le stade ultime de l'activation du lymphocyte B par son antigène spécifique est le plasmocyte dont la seule fonction est de sécréter un anticorps porteur du même paratope que l'immunoglobuline de surface du lymphocyte B ancêtre.

La lymphopoïèse B se déroule chez l'homme dans la moelle osseuse hématopoïétique et chez les oiseaux dans la bourse de Fabricius. Les cellules souches lymphocytaires B qui n'expriment aucun marqueur membranaire B et ont leurs gènes des immunoglobulines en configuration germinale vont subir, au contact des cellules stromales, plusieurs étapes de différenciation finement régulées par des contacts cellulaires ou des cytokines. Chacune de ces étapes est marquée par un réarrangement des gènes des immunoglobulines qui se fait totalement au hasard, en absence de tout contact avec l'antigène. Le produit de chaque réarrangement est exprimé à la surface de la cellule et, quand il est fonctionnel, permet de passer à l'étape suivante. Ce mécanisme implique parfois l'existence de chaînes exprimées à un seul stade, telle que la pseudo-chaîne légère VpréB-15 du stade de lymphocyte préB. La chronologie rigoureuse des réarrangements explique aussi l'exclusion allélique. On distingue ainsi quatre stades : lymphocyte proB précoce, proB tardif, préB et B immature. Cette différenciation peut également être suivie par l'apparition et/ou la disparition de marqueurs membranaires dont certains (CD19, CD20) sont spécifiques de la lignée B. L'acquisition d'une sIg fonctionnelle par cette mécanique recombinatoire se fait au prix d'une lourde perte de précurseurs B par apoptose. Elle permet l'acquisition du répertoire B et la tolérance centrale du soi.

Pour qu'elle puisse remplir ses deux fonctions après avoir lié son antigène spécifique, qui sont la transmission du signal et l'internalisation, la sIg doit être associée à la membrane du lymphocyte à d'autres molécules et former le BCR (B cell receptor). Ce sont les molécules CD79 a (Ig9) et CD79 b (Ig9). Les molécules CD22 et CD32 régulent négativement le signal alors que le complexe CD19/CD21/TAPA-1 le régule positivement. Les voies de signalisation intra-cellulaire font intervenir différentes protéine-kinases qui se lient sur des motifs spécifiques des récepteurs.

En périphérie le lymphocyte B mature, naïf, va rencontrer son antigène spécifique dans le ganglion lymphatique au sein du follicule lymphoïde. Sa maturation finale nécessite la présence de cellules folliculaires dendritiques qui lui présente l'antigène. Pour la majorité des antigènes il nécessite aussi la collaboration d'une sous-classe particulière de lymphocyte T auxiliaire $CD4^+$ Th2. Ces derniers interagissent avec le lymphocyte B grâce au couple CD40/CD40L exprimés respectivement sur les lymphocytes B et T et aux cytokines qu'ils sécrètent (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10). Cette différenciation a lieu dans le centre clair germinatif du follicule secondaire : par un mécanisme d'hypermutations somatiques les centroblastes de la zone sombre augmente la diversité et l'affinité de leur sIg que leurs descendants (centrocytes) sélectionnent au contact de l'antigène dans la zone claire du centre germinatif, avant de donner naissance soit à des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, soit à des lymphocytes B mémoire.

Une sous-population particulière de lymphocytes B, des cellules B $CD5^+$, ne suit pas toute à fait se schéma de différenciation. Il s'agit de lymphocytes B plus ancestraux dans l'ontogénie, à tropisme épithélial, producteur d'anticorps de classe IgM souvent auto-réactifs et polyspécifiques.

POUR EN SAVOIR PLUS:

GENETET N Différenciation lymphocytaire B in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 : 105-122

GENETET N Réponse immunitaire humorale in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 :415-454

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1995

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2001 : 147-153 et 181-184

TESTER-VOUS

1 - Quel type de cellules fabriquent exclusivement des chaînes μ intra-cytoplasmiques :

A - pré-pré B
B - pré B
C - B immature
D - B mature
E - plasmocyte

2 - Quel est le chiffre normal (par mm^3) des lymphocytes B $CD19^+$ dans le sang circulant d'un adulte sain

A - 1100 - 1700
B - 700 - 1100
C - 400 - 700
D - 200 - 400
E - 50 - 200

3 - Les lymphocytes B :

A - sont les précurseurs des plasmocytes, usines à anticorps
B - sont éduqués dans le thymus
C - expriment à leur surface une immunoglobuline d'une seule spécificité antigénique par lymphocyte B
D - sont en nombre à peu près égal aux lymphocytes T dans le sang circulant
E - ont besoin d'une cellule présentatrice d'antigène pour reconnaître l'antigène

4 - Les immunoglobulines de membrane des lymphocytes B matures naïfs comportent souvent deux classes, IgM et IgD. Quel(s) est (sont) le(s) caractères(s) commun(s) à ces molécules:

A - même isotype
B - même allotype de la chaîne lourde
C - même idiotype
D - même chaîne légère
E - mêmes régions variables

5 - Parmi les cytokines énumérées ci-dessous, quelle(s) est (sont) celle(s) qui n'est (ne sont) pas synthétisée(s) par le lymphocyte T $CD4^+$Th2:

A - interleukine-4 (IL-4)
B - interleukine-2 (IL-2)
C - interleukine-10 (IL-10)
D - interféron-1 (IFN1)
E - interleukine-6 (IL-6)

6 - Le récepteur des lymphocytes B ou BCR:

A - comporte un monomère d'immunoglobuline
B - est étroitement associé au complexe CD79a/CD79b
C - est multispécifique
D - reconnaît le peptide antigénique présenté par les molécules HLA
E - est présent sur le plasmocyte

LE COMPLEMENT

I - INTRODUCTION

II - NOMENCLATURE

III - LES VOIES D'ACTIVATION

III-1 La voie classique d'activation

III-1-1 Activation du C1
III-1-1-1 Le C1q
III-1-1-2 Les collectines et la voie des lectines
III-1-1-3 Le C1r et le C1s

III-1-2 Contrôle du C1

III-1-3 Formation de la C3/C5 convertase classique

III-1-4 Controle de la C3/C5 convertase classique
III-1-4-1 Contrôle plasmatique
III-1-4-2 Contrôle membranaire
III-1-4-2-1 Le DAF
III-1-4-2-2 Le CR1
III-1-4-2-3 La MCP

III-2 La voie alterne d'activation

III-2-1 Formation de la C3 convertase alterne
III-2-1-1 La C3-convertase initiale faible
III-2-1-2 La boucle d'amplification

III-2-2 Contrôle et rôle des activateurs de la voie alterne
III-2-2-1 Contrôle plasmatique
III-2-2-2 Contrôle membranaire

III-3 Similarites entre les deux voies d'activation

IV - VOIE EFFECTRICE COMMUNE

IV-1 Formation du C5b-8

IV-2 Polymérisation du C9 et formation du MAC

IV-3 Contrôle du MAC

IV-3-1 Contrôle plasmatique

IV-3-2 Contrôle membranaire

V - LES RECEPTEURS CELLULAIRES DES COMPOSANTS DU COMPLEMENT

V-1 LES RECEPTEURS DU C3 ET DU C4

V-1-1 Récepteurs du C3a/C4a et du C5a

V-1-2 Le CR1 : récepteur du C3b et du C4b

V-1-3 Le CR2 ou récepteur du C3dg/C3d

V-1-4 Le CR3 ou récepteur du C3bi

VI - LA GENETIQUE DU COMPLEMENT

VI-1 LE POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE

VI-1-1 Polymorphisme du complément et CMH
VI-1-1-1 Le facteur B
VI-1-1-3 Le C2
VI-1-1-4 Le C4

VI-2 LES DÉFICITS DU COMPLÉMENT

VII - METABOLISME DES PROTEINES DU COMPLEMENT

VIII - ACTIVITES BIOLOGIQUES DU COMPLEMENT

VIII-1 LÉSIONS MEMBRANAIRES

VIII-2 RÔLE DANS L'INFLAMMATION

VIII-3 PHAGOCYTOSE

VIII-4 INTERACTIONS AVEC LES LYMPHOCYTES

VIII-5 INTERACTIONS AVEC LES GLOBULES ROUGES

VIII-6 COMPLÉMENT ET VIH

VIII-7 AUTRES FONCTIONS DU COMPLÉMENT

LE COMPLEMENT : OBJECTIFS

Niveau A :

- **connaître les constituants des différentes voies**
- **connaître les activateurs des différentes voies**
- **connaître les séquences d'activation des différentes voies**
- **place des cations (calcium et magnésium)**
- **composition des C3convertases**
- **le pont thioester**
- **thermolabilité**
- **points d'impact des protéines régulatrices, plasmatiques et membranaires**
- **ligand des récepteurs (C1qR, C3a/'aR, C5aR, CR1, CR2, CR3, CR4)**
- **propriétés biologiques : grandes fonctions et récepteurs concernés**

Niveau B :

- **structure des collectines**
- **structure et fonction des protéines régulatrices des C3 convertases (SCR)**
- **déficits du complément**
- **polymorphisme du complément (C4, C2 et B)**
- **complément et pathogènes**

LE COMPLEMENT

Le complément a un rôle central dans la réponse immunitaire normale vis-à-vis des agents infectieux et des autres antigènes exogènes. Il représente, avec les anticorps, l'élément essentiel du système humoral de défense contre les agents infectieux. Le complément participe aussi en physiopathologie à la réaction inflammatoire et aux maladies auto-immunes, tout en intervenant dans d'autres réactions physiologiques.

I - INTRODUCTION

Le complément doit son nom à sa découverte : il agit en complément des anticorps pour la lyse des bactéries. Composant plasmatique de la réponse immunitaire naturelle, il est immédiatement recrutable, et non spécifique d'un antigène donné. Cependant il intervient dans l'initiation et la progression de la réponse immunitaire adaptative, ce qui est illustré par les conséquences des déficits en composant du complément qui ne sont pas qu'infectieuses.

*Il y a presqu'un siècle BORDET démontra qu'au moins deux facteurs sériques étaient nécessaires à la lyse de globules rouges ou de bactéries par le sérum d'animaux immunisés : l'un, **thermostable**, apparaissant spécifiquement après immunisation : c'est l'**anticorps** ; l'autre, présent en permanence dans le sérum indépendamment de toute immunisation, **thermolabile**, d'abord nommé alexine par BUCHNER (du grec* 9111111*, défendre), puis **complément** par EHRLICH. Rapidement, au début du siècle, il apparaissait que le complément n'était pas un composant sérique unique mais un ensemble de facteurs activés séquentiellement.*

Au nombre d'environ 35, les protéines du complément sont soit solubles, en majeure partie dans le plasma sanguin, soit associées aux membranes cellulaires. La vingtaine de protéines plasmatiques représente **4 à 5 % du total des protéines sériques** (retrouvées principalement dans la fraction globulinique), soit une concentration globale d'environ 300 mg/100 ml de sérum. Les études récentes ont également modifié le statut du complément dans le champ d'intérêt des immunologistes : de simple réactif de laboratoire utilisé dans des réactions sérologiques comme celle de fixation du complément son importance s'est affirmée dans les mécanismes immunologiques de défense au sein d'un organisme vivant.

L'**activation** des différents composants du complément se fait en **cascade**, de façon similaire à celle observée au cours de la coagulation ou de la fibrinolyse. Certains des composants doués d'activité enzymatique circulent sous une forme inactive (zymogène) n'acquérant leur activité protéolytique ou biologique qu'après **protéolyse limitée**, le substrat devenant l'activateur de la protéine suivante dans la cascade d'activation. Chaque enzyme pouvant activer de nombreuses molécules du précurseur suivant (de 6 à 1200), chaque étape est donc amplifiée. Outre cette **amplification** en cascade, la conséquence de l'activation est donc l'apparition de différents produits de clivage biologiquement actifs capables d'interagir avec de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

A cause de la complexité de ce système il est utile, à des fins didactiques, de le diviser en cinq groupes de protéines : la **voie classique**, à laquelle on rattache la **voie des lectines,** la **voie alterne**, la **voie effectrice commune** et un groupe de **protéines régulatrices**.

La **voie classique** est activée par certains anticorps liés à leur antigène spécifique.

De description plus récente on lui adjoint une voie dérivée d'activation par **les lectines**. Celle-ci est mise en jeu par la liaison d'une protéine, la MBP (protéine liant le mannose, ou Mannose Binding Protein) au mannose des parois de certaines bactéries.

La **voie alterne** est activée directement par certains polysaccharides bactériens en l'absence d'anticorps. Elle constitue un système de défense anti-infectieux phylogénétiquement antérieur à la voie classique et peut donc être mise en jeu avant l'instauration d'une immunité spécifique.

Ces trois cascades enzymatiques, reliées entre elles, aboutissent au **clivage du C3**, événement clé du système complémentaire : un troisième groupe de protéines plasmatiques s'assemble alors dans les structures membranaires (voie effectrice commune aboutissant au complexe d'attaque membranaire [**MAC**]) entraînant des lésions lytiques des doubles couches lipidiques membranaires. De plus le C3 déposé cible les pathogènes ou les complexes immuns

Ce système, hautement efficace, doit donc être activé rapidement et de façon localisée, ce qui nécessite des mécanismes d'amplification et de contrôle efficaces (protéines de contrôle). Celles-ci peuvent être soit plasmatiques, soit membranaires. Le contrôle s'exerce soit dès la phase initiale, quand le complément est encore en solution, soit plus tardivement après le dépôt à la surface des cellules.

Le complément est largement conservé au cours de l'évolution des espèces, ce qui témoigne de son importance tant au niveau de l'immunité non spécifique grâce aux nombreuses activités biologiques qu'il acquiert après activation qu'au niveau de l'immunité spécifique grâce à l'aide qu'il apporte aux réponses humorales et cellulaires.

II - NOMENCLATURE

Les principales caractéristiques structurales des protéines constituant le système complémentaire sont regroupées dans le tableau I et ne seront pas réitérées par la suite.

Chacun des composants de la voie classique et de la voie effectrice commune (ou voie terminale) est noté par la lettre C suivie d'un chiffre (ex. C1, C4).

Les composants de la voie alterne sont appelés facteurs et désignés par une lettre majuscule, ex. facteur B, facteur D, properdine (P). Les protéines de contrôle sont appelées par leur nom et désignées par les abréviations suivantes : inhibiteur de la C1-estérase (C1-inh), C4 binding-protein (C4-bp), facteur I, facteur H, protéine S, "decay accelerating factor" (DAF), "membrane cofactor proteïn (MCP), "homologous restriction factor" (HRF).

Les fragments de clivage enzymatique sont représentés par des lettres minuscules : ex. C4a, C4b, C4c, C4d. Les formes actives des composants sont représentées recouvertes par une barre horizontale, ex. C1r, C1s. La lettre i désigne une molécule inactive, ex. C3bi. Les chaînes polypeptidiques des protéines à structure quaternaire sont désignées par des lettres grecques : 9 pour la plus lourde, puis 9 et ensuite 1 , ex. C49 , C49 et C41 .

III - LES VOIES D'ACTIVATION

A l'exception de la **lyse cellulaire** due à l'action **directe** du MAC sur les membranes plasmiques, toutes les autres actions du complément passent par des interactions **fractions du complément/récepteurs** ou accepteurs. Ceci souligne l'importance des fragments générés au cours du processus d'activation.

Par leur intermédiaire le complément remplit de nombreuses fonctions biologiques importantes :

- prise en charge et dégradation des **complexes immuns**.
- régulation de la **réponse immunitaire**.
- intervention dans les **réactions de défense** par une reconnaissance pré-immune des microbes pathogènes et des cellules altérées de l'hôte, par sa participation à la **réponse inflammatoire** qui vise à retarder la dissémination de l'infection, par sa participation au phénomène d'**opsonisation** facilitant la phagocytose et la lyse des agents pathogènes.

L'activation du complément, qui est indispensable à l'apparition de ses activités biologiques, peut se faire soit en **phase fluide**, soit au contact de **surfaces activatrices** et aboutit à la formation de complexes enzyme-substrat ou protéine-protéine : ainsi l'apparition

de produits de clivage et de complexes multimoléculaires caractérise les stades initiaux de l'activation.

La régulation de ce système biologique hautement performant et donc potentiellement dangereux doit être très précise et très efficace. Ceci est réalisé physiologiquement par l'action conjointe de trois mécanismes :

- la **très grande spécificité** des enzymes ou des interactions protéine-protéine : ainsi C1r et C1s sont les seuls substrats de C1r ; C2 et C4 sont les seuls substrats de C1s ; C2a ne se lie qu'à C4b.
- la **demi-vie très courte** des complexes multimoléculaires.
- et surtout l'existence de **protéines régulatrices** plasmatiques, membranaires ou matricielles hautement spécifiques. Elles peuvent soit inactiver définitivement ou transitoirement un composant, soit dissocier un composant d'un complexe multiprotéique.

Ce contrôle a pour but :

- de limiter la quantité de composants activés par un stimulus donné, en focalisant la réponse au microenvironnement immédiat.
- de protéger les cellules de passage (cellules du soi) tout en focalisant l'activation du complément sur les cellules cibles, évitant ainsi une **lyse réactionnelle**.
- de contrôler la production des fragments biologiquement actifs du complément, capables de modifier les réponses inflammatoire et immunitaire.

III-1 La voie classique d'activation

La voie classique comprend **cinq** protéines : **C1q, C1r, C1s, C4** et **C2** qui sont responsables de l'assemblage de l'enzyme **C3-convertase classique** (**C14b2a**) et **trois** protéines de contrôle : le **C1-inh** (C1-inhibiteur ou inhibiteur de la C1-estérase), la **C4-bp** (C4-binding protein) et le **facteur I**.

Elle est généralement activée par des **anticorps** liés à leur antigène spécifique. Le rôle de ces derniers est de focaliser l'activation du complément sur les sites adéquates et d'y augmenter les dépôts de composants du complément. La fixation du premier composant du complément, C1q, au fragment Fc des immunoglobulines dépend de la classe et de la sous-classe de ces dernières : chez l'homme seules les **IgM, IgG1, IgG2** et **IgG3** sont capables de fixer le C1q. La capacité d'activation du C1q dans un ordre décroissant est: IgM > IgG3 > IgG1 > IgG2. Le site de liaison se situe sur le domaine C_H2 des IgG et vraisemblablement C_H3 des IgM. Toutes les classes d'immunoglobulines le posséderaient, inaccessible à l'état natif, et seules certaines classes seraient capables de l'exposer après fixation de l'antigène. Pour des raisons de valence donc de contrainte spatiale (IgM pentamérique) les IgM sont plus efficaces que les IgG pour l'initiation de l'activation du C1 puisqu'une molécule d'IgM suffit là où il faut 2 molécules d'IgG déposées à la distance adéquate pour lier efficacement le C1q.

La voie classique peut aussi être activée directement, en l'absence d'anticorps, soit par des substances capables de se fixer au C1q, soit par des substances capables de remplacer le C1q. Dans le premier cas il peut s'agir de virus, de produits de dégradation tissulaire (ADN, membranes mitochondriales, cardiolipine), protéine C réactive, complexes polyanions-polycations (héparine-protamine). Dans la deuxième catégorie on retrouve la protéine liant le mannose ou MBP ("mannose binding protein", cf infra III-1-1-2).

III-1-1 Activation du C1

L'événement initial de l'activation de la voie classique est l'interaction du C1 avec l'un de ses activateurs qui, par une chaîne de réactions, aboutit en deux étapes, à un enzyme actif : la C1-estérase pour la première étape, la C3/C5 convertase pour la deuxième.

L'activation du C1 se fait en trois étapes : (1) fixation du C1q à l'activateur, (2) activation autocatalytique du proenzyme C1r en C1r, (3) conversion par celui-ci du proenzyme C1s en C1s.

III-1-1-1 Le C1q

Le C1q est l'unité de reconnaissance du C1. Il a une structure particulière, formée par l'assemblage de six fois trois chaînes différentes (A, B et C), possèdant une extrémité N-terminale présentant une homologie avec le collagène. L'extrémité **C-terminale** des trois chaînes a une structure **globulaire** alors que l'extrémité **N-terminale** possède, elle, une structure **hélicoïdale** de telle sorte, qu'en microscopie électronique, le C1q ressemble à un "bouquet de tulipes" à six fleurs : les tiges (extrémité N-terminale "collagen-like") sont impliquées dans la liaison aux dimères C1r-C1s alors que les têtes (portion globulinique C-terminale) interviennent dans la liaison au Fc des immunoglobulines.

III-1-1-2 Les collectines et la voie des lectines

De part sa structure le C1q est apparenté à une famille de protéines appelées **collectines** qui se présentent sous la forme d'association en nombre variable de monomères ayant une extrémité N-terminale à structure "collagen-like" et une extrémité C-terminale possédant un domaine globulinique ayant une activité lectine de type C, c'est-à-dire liant spécifiquement des sucres en présence de calcium . Le C1q, à leur différence, possède une extrémité C-terminale qui n'a pas d'activité de type lectine, mais se lie, par des interactions de charge, aux immunoglobulines de façon indépendante du calcium.

*Les collectines, impliquées dans l'immunité naturelle par reconnaissance des sucres du non-soi, fonctionnent comme des opsonines, et pour certaines d'entre elles par activation directe de la voie classique du complément. Ce sont la **MPB** ("mannose binding protein", protéine liant le mannose), la **CL 43** (collectine de 43 kD), la **conglutinine**, le **Ra-RF** ("Ra-reactiv factor"), facteur bactéricide sérique des rongeurs se liant aux sucres des entérobactéries, les **SP-A** et **SP-D** ("lung surfactant protein A et D", protéines du surfactant pulmonaire A et D).*

La **MBP**, protéine sérique dont la synthèse est hépatique présente une spécificité de liaison calcium-dépendante pour des sucres se terminant par du mannose. De tels complexes polysaccharidiques sont fréquents dans les parois des micro-organismes pathogènes (bactéries, levures) alors qu'on en retrouve peu à la surface des cellules de mammifères. Elle est alors capable d'enclencher la voie classique, soit en fixant le complexe C1r-C1s, soit en fixant un équivalent, appelé **MASP-1 MASP-2** (MBP associated serine protease 1 et 2).

La MBP fonctionnerait comme un anticorps à large spectre permettant une distinction primitive entre le soi (mammifère) et le non-soi (pathogènes). Chez les invertébrés il existe une protéine qui présente 35 % d'homologie avec la MBP. La persistance de cette dernière chez les mammifères après l'apparition, au cours de l'évolution, de la réponse immunitaire adaptative laisse penser que la MBP, par ailleurs protéine de la phase aiguë de l'inflammation, joue encore un rôle important. Celui-ci serait d'assurer, chez le jeune enfant, une protection efficace durant la période de transition qui va du 6ème au 24ème mois couvrant la période débutant avec l'élimination des IgG maternelles et se terminant avec la mise en place définitive du répertoire propre de la réponse immunitaire adaptative.

III-1-1-3 Le C1r et le C1s

Le C1r et le C1s sont deux **protéases à sérine**, fortement homologues. Après activation les zymogènes inactifs sont clivés en deux chaînes, A de 56 kD et B de 27 kD reliées par un pont disulfure intracaténaire. La chaîne B possède le site actif.

Le C1 existe dans la circulation sous forme d'un complexe macromoléculaire de 740 kD associant une molécule de C1q à deux dimères de (C1r-C1s). Le maintien de sa cohésion nécessite la présence de **calcium**. Les chélateurs des cations divalents, tels que l'EDTA, dissocie ce complexe.

Le dimère (C1r-C1s) se replie après liaison au C1q avec ses unités catalytiques à l'intérieur du cône formé par les tiges du C1q et ses unités d'interaction à l'extérieur. La fixation du C1q par ses structures globulaires entraîne un changement de conformation spatiale qui est transmis au C1r le long des tiges et qui aboutit à l'autoactivation catalytique du C1r. Cette auto-activation représente le starter de la cascade protéolytique conduisant à la formation de la C3 convertase. Le C1r et le C1s se distinguent par leur spécificité enzymatique : les seuls substrats du C1r sont le C1r lui-même et le C1s alors que l'activité estérasique du C1s ne se limite pas qu'au C4 et au C2 et s'apparente à celle de la trypsine du point de vue de sa spécificité.

Pour que l'activation du C1 ait lieu il faut que plusieurs valences du C1q soient engagées, ce qui implique un caractère polyvalent des substances activatrices : c'est le cas d'un doublet d'IgG ou du pentamère d'IgM liés à un antigène. C'est aussi le cas des activateurs non immuns qui portent des structures répétitives.

III-1-2 Contrôle du C1

L'activation du C1 est contrôlée dans le sérum par un inhibiteur spécifique, le **C1-inh**. C'est une glycoprotéine caractérisée par sa très forte teneur en sucres (35 %).

Le C1-inh appartient à la superfamille des inhibiteurs des protéases à sérine ou "**serpine**" (serine protease inhibitor) qui regroupe l' 9-1-anti-trypsine, l' 9-1-anti-chymotrypsine, l' 9-2-anti-plasmine, l'anti-thrombine III.

Le degré d'homologie entre le C1-inh et les autres serpines varie de 20 à 27 % et est plus prononcé pour le fragment C-terminal où se situerait le site actif. Comme toutes les serpines le C1-inh possède un site amorce ou centre réactif qui est clivé par la protéase qu'il inhibe. Après ce clivage la protéase est liée de manière covalente et son activité enzymatique inhibée. Le C1-inh est aussi capable d'inhiber d'autres protéases à sérine : la plasmine, la kallikréine, les facteurs XIa et XIIa.

Le C1-inh prévient l'activation du C1r en phase liquide et inactive le C1 activé. Il ne prévient pas l'activation du C1 par un activateur physiologique. En effet à l'état physiologique le C1-inh est en excès molaire par rapport au C1 (rapport 9/1). Deux molécules de C1-inh sont liées de manière réversible aux sites des deux molécules de C1r, prévenant ainsi l'autoactivation. La protéase C1r n'étant pas active, il n'y a donc pas clivage du C1-inh et donc pas formation de complexes covalents serpine/protéase inactivée. Elles sont déplacées par les activateurs du C1q

Le C1-inh interagit de manière covalente par une liaison ester avec le C1s, puis le C1r, pour abolir l'activité estérasique du premier et les dissocier du C1q sous la forme de deux molécules de C1r-C1s-$(C1\text{-}inh)_2$ d'environ 380 kD, dans lesquelles les sites enzymatiques sont définitivement bloqués.

*Dans la substance inter-cellulaire, on retrouve un protéoglycan sulfaté, la **décorine**, capable de fixer le C1q et de l'inactiver.*

III-1-3 Formation de la C3/C5 convertase classique

La particularité du **C4** et du **C3,** qu'ils partagent aussi avec l' 9**-2-macroglobuline**, est de posséder sur leur chaîne 9 et plus particulièrement dans les régions C4d et C3d un **pont thioester** entre le groupement -SH d'une cystéine et le groupement -COOH d'un acide glutamique. Le C5 ne possède pas cette séquence et n'a donc pas de pont thioester. Ce pont thioester permet au C3, et au C4, de se lier de manière covalente, après activation, aux surfaces biologiques par une liaison de type amide ou ester selon qu'elle se fait avec des groupes aminés ou hydroxyles.

La C1-estérase clive la chaîne 9 du C4 dans sa partie N-terminale libérant un polypeptide du 8,8 kD, le **C4a**. Sur la molécule de **C4b** nouvellement formée apparaît, pendant un temps très bref un site actif de liaison covalente aux membranes biologiques ou aux complexes immuns par ouverture du pont thioester. En raison de ce délai très court seule une faible proportion (10 %) du C4 activé se lie effectivement aux immunoglobulines ou aux cellules. Ce faible rendement est compensé par la forte concentration du C4.

L'action de la C1-estérase sur le C4 fait apparaître par ailleurs un site de liaison **magnésium** dépendant pour le **C2**. Le C2 circule à très faible concentration dans le sérum et est particulièrement sensible à l'action de la chaleur. La liaison du C2 au C4b favorise l'activation du C2 par le C1s qui, par clivage, produit 2 fragments : **C2b** et **C2a** porteur d'un site enzymatique de type sérine estérase. Ce complexe enzymatique C4b2a, où les deux composants sont liés de manière non covalente, a pour substrats spécifiques le C3 et le C5 : c'est le **C3/C5 convertase classique**.

L'addition d'une molécule de C3b au complexe C4b2a lui confère une activité C5 convertase. Le C5 se lie au C3b et au C4b et est soumis à l'action estérasique du C2a.

III-1-4 Contrôle de la C3/C5 convertase classique

III-1-4-1 Contrôle plasmatique

Le complexe enzymatique C4b2a très instable, a une demi-vie très brève à 371C conduisant à une **dissociation spontanée** du C2a qui perd irréversiblement son activité enzymatique. Cette dissociation spontanée est accélérée par la **C4-bp** qui par ailleurs sert de **cofacteur** au facteur I. Ce dernier est un enzyme capable de cliver la chaîne 9 du C4b en 3 fragments.

Le **facteur I** est une enzyme de type protéase à sérine qui possède deux substrat dans la cascade du complément: le C4b et le C3b, qu'ils soient solubles ou dépôsés sur les membranes. Il en résulte des produits de clivage qui ne peuvent plus participer à la formation d'une C3-convertase, mais qui sont capables d'interagir avec des récepteurs cellulaire spécifiques. Son action nécessite la présence de cofacteurs variables selon la voie (classique ou alterne) et le site d'action (plasma ou membrane).

Des trois fragments résultants de son action sur le C4b, le **C4d** reste lié à la surface activatrice ou au complexe immun ; les deux autres, liés aux chaînes 9 et 1 par des ponts disulfures forment le **C4c** qui est relargué dans la phase fluide. Dans la plupart des situations physiologiques la concentration de C4bp est largement en excès par rapport au C4b produit, ce qui prévient toute activation potentiellement délétère de la voie classique.

III-1-4-2 Contrôle membranaire

Le complexe C4b2a déposé sur une cellule peut aussi être soumis à l'action de facteurs de contrôle de la membrane cellulaire.

III-1-4-2-1 Le DAF

A la surface des hématies humaines deux protéines de membrane ont une activité équivalente à celle de la C4-bp : le **DAF** (pour "decay accelerating factor", facteur accélérant la dissociation) encore appelé **CD55**, est une glyocoprotéine monocaténaire distribuée à la surface de nombreuses cellules : érythrocytes, leucocytes, cellules épithéliales et endothéliales. Il présente la particularité d'être ancré dans la membrane par une liaison à un glycolipide de membrane, ce qui facilite les mouvements rapides dans cette dernière. Il accélère la dissociation spontanée du C4b2a. Le DAF sert par ailleurs de **récepteur à E. Coli**.

III-1-4-2-2 Le CR1

Le récepteur pour le C3b et le C4b (**CR1**) accélère aussi la dissociation spontanée du complexe et sert également de cofacteur à I pour cliver le C4b, bien qu'étant plus efficace sur la C3 convertase alterne.

III-1-4-2-3 La MCP

Enfin la **MCP**, "membrane cofactor protein" encore appelé **CD46**, sert de cofacteur au facteur I pour le clivage du C4b avec une affinité cependant moindre que pour le C3b.

III-2 La voie alterne d'activation

Quand des polysaccharides tels que le zymosan ou des endotoxines sont ajoutés à un sérum normal on observe une consommation du C3 sans diminution significative du C1, du C4 ou du C2. Ces observations, initialement décrites par PILLEMER à la fin des années 1950, montraient à l'évidence qu'il existait une voie alterne pour le clivage du C3 et l'activation de la voie terminale.

Quatre protéines sont impliquées dans la formation de la C3 convertase alterne : le composant **C3b**, les **facteurs B** et **D** et la **properdine** (P).

On distingue deux phases dans l'activation de la voie alterne : une **phase initiale non spécifique**, indépendante de la présence d'activateur et une **phase d'amplification** strictement contrôlée par des protéines régulatrices et ne pouvant fonctionner qu'à la surface de particules activatrices.

La voie alterne peut être activée, en l'**absence d'anticorps** par un grand nombre de particules biologiques incluant : de nombreux microorganismes (bactéries, parasites, levures) ainsi que des lipopolysaccharides extraits de leurs membranes (zymosan, endotoxines), des cellules infectées par des virus, des substances comme l'agarose, l'inuline ou des IgA agrégées.

III-2-1 Formation de la C3 convertase alterne

Le **C3** est le composant du complément le plus fortement représenté dans le sérum et son activation est le **pivot** sur lequel s'articulent les deux voies d'activation classique et

alterne. L'image d'une veilleuse pouvant permettre une illumination très intense à un moment donné correspond assez bien aux deux séquences de réaction de la voie alterne :

- formation d'une C3-convertase initiale, faible, soluble
- formation d'une C3-convertase forte, membranaire, auto-amplificatrice.

III-2-1-1 La C3-convertase initiale faible

Le pont thioester est activé par les C3-convertases classique et alterne. Bien que protégé de l'action de l'eau dans la molécule de C3 natif, il est quand même susceptible à une hydrolyse spontanée lente capable de générer à bas bruit dans le plasma une molécule de type C3b ("**C3b-like**" ou **C3 [H_2O]**), qui est une molécule de C3 intacte (avec C3a) ayant perdu son pouvoir hémolytique mais possédant les propriétés biologiques du C3b par exposition et activation du pont thioester. Ce phénomène est appelé "tick-over" par les anglo-saxons (tourné au ralenti : le fonctionnement en veilleuse n'a pas de conséquence, et permet un éclairage intense immédiat si besoin). La molécule de C3b like n'est plus sensible à l'action des C3-convertases, est toujours capable de se lier au facteur H et est donc susceptible au clivage par le facteur I, est toujours apte à se lier au facteur B et ainsi d'initier en phase fluide, la voie alterne du complément (cf. infra), et enfin est capable de se lier au récepteur CR1. Celle-ci est capable, sur une surface activatrice, d'initier la boucle d'amplification de la voie alterne en s'associant au facteur B pour former une C3-convertase initiale faible, C3 (H_2O) B.

III-2-1-2 La boucle d'amplification

Ces conditions sont perturbées lorsque la convertase initiale faible se forme au contact de surfaces activatrices, pauvres en acide sialique (surface de pathogènes). Les facteurs régulateurs (H et I) n'ont plus accès à la convertase, et une boucle d'amplification peut se mettre en place.

La phase d'amplification fait intervenir deux composants les **facteurs B** et **D** et est initiée lorsque des molécules de C3b se complexent avec le facteur B, en présence d'ions **magnésium** pour former un complexe réversible le C3bB. Le facteur B, est alors soumis à l'action du facteur D, qui est la seule enzyme du complément à circuler sous forme active, mais qui est aussi le composant le moins représenté en unité de masse dans la circulation. Il libère un fragment Ba relargué dans la phase fluide alors que l'autre fragment Bb reste lié au C3b. Le complexe C3bBb est la C3-convertase alterne analogue au C4b2a de la voie classique. Ces deux convertases clivent l'extrémité N-terminale de la chaîne 9 du C3, libérant dans le plasma un petit peptide de 9 kD, le **C3a**, alors que le reste de la molécule (**C3b**) exprime de façon transitoire un site de liaison covalente par réaction de transestérification avec des résidus carbohydrates des immunoglobulines ou des polysaccharides.

Le C3b, produit de l'activité enzymatique des C3 convertases sur le C3, est lui-même constituant de la C3-convertase alterne, ce qui a pour conséquence la possibilité d'interrelations, in vivo, des deux voies d'activation et l'existence d'un **circuit rétroactif positif** du C3b, à la fois produit de clivage et composant de départ de la C3-convertase alterne qui nécessite un contrôle dans le sérum par des protéines régulatrices pour éviter une consommation totale du C3 et du facteur B.

III-2-2 Contrôle et rôle des activateurs de la voie alterne

III-2-2-1 Contrôle plasmatique

Comme le C4b2a, le C3bBb est **instable** et se dissocie spontanément et irréversiblement en quelques minutes à 371C libérant le fragment Bb qui perd son activité C3-convertase. L'enzyme peut être stabilisé par la liaison d'une protéine, la **properdine** (P) au C3b, ce qui multiplie par un facteur 10 sa durée de vie.

La dissociation spontanée du C3bBb est par contre accélérée par une protéine sérique, le **facteur H**, qui se lie spécifiquement au C3b en chassant dans la phase fluide le Bb et en empêchant toute réassociation de nouvelles molécules de B au C3b. De manière analogue à la C4-bp pour la C3-convertase classique, H sert aussi de cofacteur au facteur I qui clive la chaîne 9 du C3b pour former une molécule inactive (C3bi) incapable de lier B pour former une C3-convertase. En présence de récepteur pour le C3b (CR1), I poursuit à la surface des cellules le clivage du C3bi en un fragment (C3dg) qui reste lié à la membrane cellulaire et un autre (C3c) libéré dans la phase fluide.

III-2-2-2 Contrôle membranaire

Par ailleurs, le complexe C3bBb déposé sur une cellule est, comme la C3-convertase classique, sensible à l'activité inhibitrice de protéines de membrane comme le **CR1**, le **DAF** et la **MCP** déjà décrits, ces deux dernières ayant une action complémentaire (le DAF accélèrent la dissociation et le MCP favorisant le clivage). La **MCP** a une distribution analogue à celle du DAF, à l'exception notable des érythrocytes, et sert par ailleurs de **récepteur au virus de la rougeole**.

Le C3b formé au cours de la phase initiale d'activation de la voie alterne est immédiatement soumis à la protéolyse par I.

Cependant, s'il se lie à une substance activatrice il est alors protégé des effets régulateurs de I et de H, et en conséquence, une grande quantité de C3bBb est formée. Ceci permet de recouvrir les microorganismes envahisseurs de grande quantité de C3b facilitant la phagocytose par adhérence immune au CR1 des cellules phagocytaires et/ou la lyse par activation du C5 suivi de la mise en jeu du complexe d'attaque membranaire. Les activateurs de la voie alterne opèrent par passage des réactions de la phase fluide à la phase solide où elles sont amplifiées. La composition en sucres est l'élément capital pour ce pouvoir activateur et plus particulièrement la teneur en acide sialique. Des surfaces pauvres en acide sialique telles que le zymosan, les globules rouges de lapin, sont de puissants activateurs de la voie alterne. Sur ces surfaces l'affinité de H pour le C3b est réduite, favorisant la liaison de B à C3b.

*En situation expérimentale ou en pathologie le C3bBb peut être stabilisé de manière non physiologique produisant une activation non contrôlée de la voie alterne. Le **venin de cobra** contient, entre autre, dans ses toxines du C3b qui est résistant à l'action des facteurs I et H humain. La C3-convertase ainsi formée C3b (cobra)-Bb (humain) est très stable. Au cours de certaines glomérulonéphrites membrano-prolifératives on observe un auto-anticorps de classe IgG, dirigé contre le C3bBb qui a pour effet de le stabiliser, empêchant le déplacement de Bb par le facteur H. Cet auto-anticorps est appelé **facteur néphrétique** ou C3Nef.*

III-3 SIMILARITES ENTRE LES DEUX VOIES D'ACTIVATION

La liaison du C4b au C2 est magnésium dépendante dans la C3-convertase classique tout comme celle du C3b au facteur B dans la C3-convertase alterne. C4b et C3b présentent des homologies de structure (pont thio-ester) et sont dégradés par I avec comme cofacteurs respectifs la C4bp et H. C2 et B sont des protéines monocaténaires de même poids moléculaire, portant après activation respective par C1s et D le site actif pour le C3 sur leur plus lourd fragment de clivage, C2a et Bb, qui présentent par ailleurs le même phénomène de dissociation spontanée des C3-convertases. Enfin, tout comme le C4, C2 et B sont codés dans

le complexe majeur d'histocompatibilité sur le chromosome 6. La C4-bp et H se liant respectivement au C4b et au C3b sont les cofacteurs de I pour le clivage du C4b et du C3b et accélèrent la dissociation spontanée des C3-convertases.

IV - VOIE EFFECTRICE COMMUNE

IV-1 Formation du C5b-8

La séquence terminale est activée quand le C3 est clivé par le C4b2a ou le C3bBb. Certaines des molécules de C3b formées peuvent se lier à proximité de la C3-convertase modifiant sa spécificité pour le C5 en servant de récepteur pour ce dernier à condition d'être libre de B, P ou H. La protéolyse par C2a ou Bb détache de la partie N-terminale de la chaîne 9 un petit peptide de 12 kD, le **C5a**. Sur la molécule de **C5b** nouvellement formée apparaît transitoirement un site de liaison aux membranes, non covalent à la différence du C4b et du C3b. Ce site de liaison est stabilisé par l'adjonction de C6 et l'addition de C7 permet l'ancrage du complexe C5b67 dans la couche bilipidique des membranes. La liaison du C5b6 au C7 démasque sur ce dernier des sites de liaison hydrophobe qui permette l'ancrage du complexe trimoléculaire dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Le C5b67 devient une protéine de membrane intégrale et sert de récepteur pour le C8. Le C8 se lie par sa chaîne 9 au complexe C5b-7. Cette liaison nécessite la présence de calcium. La liaison de la chaîne 9 au C5 induit un changement conformationnel qui permet à la chaîne 9 du C8 de pénètrer dans la partie hydrophobe de la membrane. Le C5b-8 a tendance à s'agréger, pénétrer partiellement les membranes et initier une réaction de lyse très lente.

IV-2 Polymérisation du C9 et formation du MAC

L'interaction du C5b-8 avec le C9 entraîne une polymérisation de 12 à 16 molécules de C9. Le C9 présente des homologies avec la perforine, autre protéine capable de faire des pores dans les membranes des cellules, retrouvée dans les granules des lymphocytes T cytolytiques. La composition du MAC est hétérogène et peut donc s'écrire $C5b6789_n$ avec n variant de 1 à 18. Il s'agit d'un complexe tétramolécunaire C5b-8 (de 550 kD) associé à un poly C9 tubulaire (d'environ 1100 kD). Les complexes amphiphiles C5b-9 (ou complexe d'attaque membranaire ou MAC) apparaissent en microscopie électronique comme des trous sombres de 10 nm de diamètre entourés d'un anneau correspondant à une partie centrale hydrophilique pour le passage de l'eau et des électrolytes entourée par une zone hydrophobe pour l'ancrage dans la membrane.

La lyse par le MAC est efficace dans tous les cas où la cellule-cible est anucléée (bactérie, globule rouge). En revanche, dans le cas des cellules nucléées, une résistance par englobement du MAC dans des vésicules d'exocytose se développe. Il existe cependant un effet sub-lytique avec relargage de médiateurs de l'inflammation (cytokines, éicosanoïdes, radicaux libres d'oxygène).

IV-3 Contrôle du MAC

IV-3-1 Contrôle plasmatique

Le MAC conduit donc à la **lyse osmotique** de la cellule et est sous contrôle plasmatique de la protéine S et de la clusterine qui empêchent la fixation du C5b-7 aux

membranes et la polymérisation de C9 au contact du C5b-8 et sous celle du HRF qui inhibe la formation de C5b-8 et la polymérisation de C9.

La **protéine S** est une glycoprotéine plasmatique dont la structure est identique à celle de la vitronectine qui appartient à la famille des protéines d'adhérence cellulaire, avec la laminine et la fibronectine. Incorporée dans le complexe C5b-7, elle le rend hydrophile, et donc incapable de s'enchâsser dans la membrane plasmique.

La **clustérine** est la deuxième protéine sérique régulatrice du complexe d'attaque membranaine en phase fluide d'individualisation récente. Il s'agit d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités non identiques de même poids moléculaire (35 kD) reliées entre elles par cinq ponts disulfures. Trente pour cent de la molécule correspondent à des sucres branchés par des liaisons -N. Sa portion N-terminale possède une structure d'hélice 9 amphipathique capable d'interagir avec les parties hydrophobes des composants terminaux du complément entrant ainsi en compétition avec les composants de la bi-couche lipidique des membranes. Par sa liaison avec les composants C7, C8ß et C9 la clustérine, tout comme la vitronectine peut donc empêcher le dépôt du MAC dans les membranes.

IV-3-2 Contrôle membranaire

*Le **HRF** ou facteur de restriction homologue est la protéine régulatrice membranaire du MAC. Il s'agit d'une protéine membranaire dont l'existence a été soupçonnée suite aux résultats expérimentaux montrant, entre différentes espèces, une plus grande résistance, pour une espèce donnée, à la lyse cellulaire par le complément homologue. Autrement dit il semblait exister à la surface des cellules une ou des protéines capables de protéger ces dernières de l'attaque par le propre complément de l'hôte, d'où le nom de facteur de restriction homologue ou HRF (pour "homologous restriction factor"). Ce phénomène n'est pas une reconnaissance spécifique du soi. Il intéresse le phénomène de lyse réactionnelle initiée par les complexes C5b6 réagissant avec le C7 au voisinage des membranes des cellules de l'hôte indépendamment des stades précoces (antérieurs à C5b).*

On a maintenant isolé deux protéines de poids moléculaires différents qui remplissent cette fonction : une de 65 kD, encore appelée **C8 binding protein** ou **C8bp** et une de 18-20 kD encore appelée **HRF 20**, dont le gène est sur le bras court du chromosome 11. Ces deux protéines sont insérées dans la membrane par l'intermédiaire d'une molécule de **phosphatidylinositol**, tout comme le DAF.

La **C8bp** se lie à la sous-unité C89-1 et empêche ainsi la polymérisation du C9. Des résultats contradictoires existent quant à son possible rôle inhibiteur de la lyse par les CTL.

Le **HRF20** ou **CD59** est un inhibiteur tardif du MAC : après liaison au C89 il se lie à la première molécule de C9 se fixant au complexe C5b-8 empêchant son correct déploiement indispensable à son insertion dans la membrane plasmique et ainsi à la polymérisation du C9.

*Un déficit du complément interviendrait dans la pathogénie de l'**hémoglobinurie paroxystique nocturne** rendant les hématies anormalement sensibles à la lyse par le complément. Ceci s'expliquerait par la conjonction de deux anomalies biologiques : un **déficit en DAF** responsable d'une augmentation de la demi-vie des C3 convertases, principalement alterne, sur la surface du globule rouge avec pour conséquence un dépôt accru de C3b et enclenchement de la boucle d'amplification (cf. infra) ; une sensibilité accrue à la lyse par le MAC lié à un **déficit en HRF**. La base commune à ces deux anomalies est un **déficit en phosphatidylinositol** qui est indispensable à l'ancrage de ces deux molécules membranaires à la surface de l'érythrocyte.*

V - LES RECEPTEURS CELLULAIRES DES COMPOSANTS DU COMPLEMENENT

De nombreux récepteurs cellulaires spécifiques de certains composants du complément ont été récemment décrits et permettent de mieux comprendre le mode d'action de ce dernier. On les retrouve à la surface de nombreuses sous-populations cellulaires sanguines circulantes ; ils existent aussi dans bon nombre de tissus. Tous ces récepteurs, à l'exception de celui pour le facteur H, interagissent uniquement avec la forme **active**, clivée, du composant ; ils ont très peu, si ce n'est aucune, affinité pour la forme native. L'activation du complément est donc, là encore, indispensable à son activité biologique dépendant de ses interactions avec les cellules.

V-1 Les recepteurs du C3 et du C4

V-1-1 Récepteurs du C3a/C4a et du C5a

Un récepteur pour les **anaphylatoxines C3a** et **C4a** est retrouvé sur les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et basophiles, les mastocytes. La structure exacte de ce récepteur n'est pas encore complètement élucidée. L'interaction du C3a (ou du C4a) avec son récepteur entraîne in vitro la contraction des muscles lisses (d'iléum ou d'utérus de cobaye). Sur les polynucléaires neutrophiles ils induisent la libération des enzymes contenus dans les granules alors que sur les polynucléaires basophiles et les mastocytes leur liaison provoque la libération des amines vaso-actives. Le récepteur lie l'anaphylatoxine par son extrémité C-terminale où se situe l'arginine qui est l'un des composants de la liaison cible des C3-convertases. Les composés désarginés après action de la **carboxypeptidase N** ne sont plus capables de se fixer au récepteur et sont donc inactifs.

Le **récepteur du C5a**, distinct, est mieux caractérisé. Son gène, cloné, code pour une molécule de 52 kD, qui appartient à la famille des serpentines ou récepteur de type glycoprotéine trans-membranaire à sept portions membranaires.

Il se présente sous forme d'oligomères de 150 à 200 kD. Sa portion intra-cytoplasmique possède plusieurs sites de phosphorylation et des motifs caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines liant le GTP. Son expression n'est pas augmentée par l'activation des polynucléaires.

V-1-2 Le CR1 : récepteur du C3b et du C4b

Le C3b et le C4b interagissent avec un récepteur, appelé CR1. Le CR1 est retrouvé sur les globules rouges, les lymphocytes B certaines sous-populations de lymphocytes T, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages et, dans les tissus, sur les podocytes glomérulaires et les cellules dendritiques réticulaires. On ne le retrouve sur les érythocytes que chez les primates et l'homme.

Il est reconnu par des anticorps monoclonaux appartenant au **CD35**. C'est une glycoprotéine de membrane qui a la particularité de se présenter sous la forme de quatre allotypes .

Les effets biologiques du CR1 sont variés et sont fonction du ligand et du type cellulaire qui exprime le récepteur. Ils sont au nombre de quatre :

- il **inhibe l'activation** du complément en contrôlant les C3/C5 convertases classique et alterne. Il possède les deux fonctions des protéines régulatrices de ces dernières : il accélère leur dissociation spontanée et sert de cofacteur au facteur I pour le clivage. Son exceptionnelle longueur lui permet de contrôler l'assemblage des convertases sur des surfaces situées à distance.

- Il participe à la **clairance des complexes immuns** portant du C3b. La fixation de ces derniers au globule rouge protège contre les risques de dépôts tissulaires et permet leur livraison dans les sites privilégiés (foie, rate) où ils seront dégradés par les cellules

phagocytaires du système réticulo-endothélial. Le globule rouge, équipé de DAF dans sa membrane, est ainsi protégé contre la formation de C3-convertase à sa surface par les complexes immuns transportés en l'état puisqu'il n'y a pas, par contre de MCP susceptible de favoriser leur clivage par le facteur I.

- Il permet l'**opsonisation** par les macrophages ou les polynucléaires de particules ou de microorganismes recouverts de C3b favorisant ainsi leur phagocytose.

- Enfin il participe vraisemblablement à la **régulation de la réponse immunitaire** : régulation de la production d'immunoglobulines par liaison aux lymphocytes, production de lymphocytes mémoire par liaison aux cellules dentritiques.

V-1-3 Le CR2 ou récepteur du C3dg/C3d

Le CR2 est une glycoprotéine monocaténaire de 145 kD qui reconnaît le **C3dg/C3d** et le virus d'Epstein Barr (**EBV**). Ceci porte à trois le nombre des composants membranaires du complément dont l'utilisation est détournée par les micro-organismes comme récepteurs cellulaires pour leur pénétration (DAF et E. Coli, MCP et virus de la rougeole, CR2 et EBV). Il est reconnu par des anticorps monoclonaux appartenant au **CD21**. Il n'est retrouvé qu'à la surface des lymphocytes B et des cellules dendritiques folliculaires.

Tout comme celui du CR1 son gène est localisé sur le chromosome 1, dans une région maintenant définie comme "cluster RCA" (pour "regulation of complement activation"), avec d'autres protéines qui ont en commun leur capacité à se lier au C3b ou au C4b et de réguler l'activité des C3/C5 convertases: le facteur H (H), la C4 binding protéine (C4bp) et le decay accelerating factor (DAF) préviennent la formation et accélèrent la dissociation spontanée de ces enzymes. Le récepteur du C3b (CR1),la protéine cofacteur de membrane (MCP), mais aussi H et C4bp servent de cofacteurs à la dégradation du C3b et du C4b par la protéase à serine qu'est le facteur I. Structuralement ces protéines ont la propriété de partager en nombre variable des unités d'environ 60 acides aminés (SCR des anglosaxons : "short consensus repeat").

Le CR2 intervient dans la **régulation de la réponse immunitaire** par activation des lymphocytes B et dans l'induction de lymphocytes B mémoire par liaison aux cellules dendritiques.

V-1-4 Le CR3 ou récepteur du C3bi

Le CR3 est le récepteur du fragment **C3bi**. Il est retrouvé à la surface des cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, granulocytes), des cellules folliculaires dentritiques et des grands lymphocytes granuleux (ou LGL pour "large granular lymphocytes").

C'est un hétérodimère constitué de deux chaînes associées de manière non covalente : une **chaîne** 9 de 110 kD reconnue par les anticorps monoclonaux du **CD11b** et une **chaîne** 9 de 95 kD reconnus par ceux du **CD 18**. Il appartient à une famille de protéines d'adhérence cellulaire avec la molécule **LFA-1** et le **CR4**. Ces trois hétérodimères possèdent la même chaîne 9_2 de 95 kD : seule la chaîne 9 est variable avec un poids moléculaire de 180 kD pour celle de LFA-1 et 150 kD pour celle de CR4. Cette famille est celle des 9_2-intégrines.

La liaison du C3bi à son récepteur dépend de la présence des cations (**calcium**), ce qui singularise le CR3 de tous les autres récepteurs du complément.

Le gène de la chaîne 9 est cloné et localisé sur le chromosome 21.

La fonction du CR3 est donc double :

- il intervient dans les phénomènes d'**opsonisation** et de phagocytose pour les particules ou les cellules recouvertes de C3bi.

- Il facilite les **contacts cellulaires**.

V-1-5 Le CR4 ou p150/95

Le CR4 lie aussi le **C3bi**, est exprimé à la surface des cellules myéloïdes et de certains lymphocytes activés. La taille de sa chaîne 9 (150 kD) le différencie du CR3. Elle est reconnue par des anticorps monoclonaux du **CD11c**. Son rôle physiologique est peu connu mais semble proche de celui du CR3.

Nous ne ferons que citer les récepteurs pour le C3e, pour le C1q et pour le facteur H.

VI - LA GENETIQUE DU COMPLEMENT

La localisation chromosomique de la plupart des composants, à l'exception de celle du facteur D est actuellement connue (tableau 1). Certains sont regroupés sur un même chromosome : chaîne A et B du C1q, chaînes 9 et 9 du C8 sur le chromosome 1p : facteur H, C4bp, DAF, MCP, CR1 et CR2 sur le chromosome 1q : B, C2 et C4 sur le chromosome 6 au sein du MHC, C1r et C1s sur le chromosome 12 (tableau 1).

VI-1 Le polymorphisme génétique

Des **variations allotypiques** existent pour environ la moitié des protéines du complément, responsables d'un polymorphisme génétique. Au niveau protéique elles sont mises en évidence par des techniques d'immonunofixation ou d'isoléectrofocalisation. Elles ont été décrites pour les protéines suivantes : C2, C3, C4, C6, C7, C8, B, C1-inh, I, CR1.

VI-1-1 Polymorphisme du complément et CMH

L'intérêt majeur des études génétiques du système du complément réside dans le fait que trois composants, tous impliqués dans la formation des C3 convertases, à savoir le C2, le C4 et le facteur B sont codés dans le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité).

L'isolement d'ADNc pour C2, C4 et B a permis de préciser au sein du CMH l'ordre respectif de ces trois gènes. Ils sont situés entre les gènes de classe II en 5' et les gènes de classe I en 3'. Les gènes du C2 et du facteur B ne sont séparés que par 421 bp, C2 étant le plus en aval. C4A est situé 30 kb en amont et est lui-même distant de 10 kb environ du C4B.

VI-1-1-1 Le facteur B

Chez les caucasoïdes on décrit deux allèles communs F et S, deux allèles moins fréquents F1 et S1, et environ 14 allèles très rares. Ces allèles sont d'expression codominante.

VI-1-1-3 Le C2

Le polymorphisme du C2 a été démontré par isoélectrofocalisation : il est limité car en effet il existe un allèle commun C2C et deux allèles rares C2B (basique) et C2A (acide) ainsi qu'un allèle nul, C2QO. La fréquence de ce dernier est de 1 % (1 homozygote pour 10000 sujets); Neuf fois sur dix ce déficit est lié à l'haplotype HLA-A10, -B18, -Dw2.

VI-1-1-4 Le C4

Le C4 est codé par deux loci étroitement liés **C4A** et **C4B** ; il est extrêmement variable puisqu'environ 35 allèles ont été décrits pour les deux loci dont les produits n'ont pas la même réactivité. La migration électrophorétique des produits du locus C4A est plus rapide mais l'activité fonctionnelle, hémol ytique, de ceux du locus C4B est environ quatre fois supérieure.

Bien que le déficit total en C4 soit extrêmement rare la fréquence des allèles nuls à chaque locus (C4A QO : 5 - 15 % ; C4B QO : 10 - 20 %) explique l'importance relative des déficits partiels. L'allèle C4A QO est plus fréquemment retrouvés chez les patients lupiques.

VI-2 Les déficits du complément

Des déficits héréditaires ont été décrits pour tous les composants du complément, hormis pour le facteur B et la C4-bp. Il s'agit le plus souvent de déficits de synthèse, moins fréquemment de déficits fonctionnels (protéine présente mais biologiquement inactive).

Le plus fréquent concerne le **C1-inh**, à transmission **autosomique dominante**, responsable de l'**oedème angio-neurotique héréditaire** (OAN). Les autres déficits sont de transmission autosomique récessive à l'exception de celui de la properdine qui est récessif lié à l'X. Les enquêtes épidémiologiques ont évalué la fréquence des déficits du complément entre 0,03 et 0,09 %. Les déficits en composants de la voie classique sont préférentiellement associés à des anomalies auto-immunes de type lupique alors que ceux des composants de la voie terminale le sont plus avec des infections bactériennes (au genre Neisseria notamment).

L'OAN se caractérise par des poussées, durant 4 à 72 heures, d'oedème indolore, non prurigineux, ne prenant pas le godet, récidivant. Les poussées sont souvent déclenchées par des traumatismes (avulsions dentaires) des efforts; les crises débutent le plus souvent après la puberté et leur localisation, souvent unique pour une même crise, intéresse les extrémités, la face, les muqueuses. La localisation intestinale est responsable de douleurs abdominales intenses parfois confondues avec des tableaux d'urgence chirurgicale alors que la localisation aux voies respiratoires supérieures en fait toute la gravité, risquant de mettre en jeu le pronostic vital. La physiologie du déficit en C1-inh est imparfaitement connue : l'activation non contrôlée du C1 lors d'un traumatisme aboutirait non seulement à la consommation du C4 et du C2 mais aussi à l'activation des systèmes contacts (facteur XII et kallikréine dont le C1-inh est le principal inhibiteur). Il en résulterait la formation de petits peptides à activité kinine responsables des manifestations oedémateuses. Le diagnostic repose sur l'effondrement du C4, la normalité du C3 en conjonction avec un CH50 nul. L'enquête familiale s'impose. Dans 85 % des cas le dosage pondéral retrouvera un C1-inh à 5-30 % de la normale. Cependant dans 15 % des cas le taux est normal et le diagnostic nécessite un dosage fonctionnel de l'activité du C1-inh, qui est basse. Le traitement de fond repose sur l'administration d'androgènes atténués (danazol[2]) qui agirait sur la synthèse hépatique par le gène sain. Celui des crises fait appel aux transfusions de plasma frais ou de C1-inh purifié.

VII - METABOLISME DES PROTEINES DU COMPLEMENT

La synthèse est essentiellement hépatique (95 %) mais il existe une synthèse minime monocytaire et macrophagique de certains composants (ensemble des facteurs de la voie alterne et C2, C3 et C4) dont l'importance locale aux sites d'inflammation est certaine. Le C1 est synthétisé par les cellules épithéliales des tissus thymiques, intestinaux et par les fibroblastes. Les protéines du complexe lytique sont en partie synthétisées par les lymphocytes. Il est désormais démontré que d'autres cellules, telles que les adipocytes, les astrocytes, les cellules épithéliales de l'endomètre, sont capables de synthétiser certains composants du complément. La synthèse est accrue lors de l'inflammation et est sous contrôle hormonal stéroïdien (augmentation par les androgènes). Le catabolisme, peu connu, est excessivement rapide comparé à celui des autres protéines plasmatiques, peut-être dû à une activation permanente à bas bruit.

VIII - ACTIVITES BIOLOGIQUES DU COMPLEMENT

VIII-1 Lésions membranaires

C'est la seule action du complément qui ne fait pas intervenir une liaison à un récepteur. Par activation du MAC le complément entraîne directement la **lyse osmotique** des cellules. Certaines cellules tumorales sont résistantes à la lyse par le MAC, et certaines bactéries n'y sont sensibles qu'en présence de co-facteurs, tels que le lysozyme.

VIII-2 Rôle dans l'inflammation

En réponse au **C3a, C4a** et **C5a**, petits peptides à forte homologie de séquence, appelés **anaphylatoxines**, les mastocytes, basophiles et plaquettes libèrent des amines vasoactives (histamine, sérotonine) qui participent à la réaction inflammatoire.

Ce sont des peptides de relativement faible poids moléculaire, environ 10 kD, actifs à des concentrations très faibles, pico ou nano-molaires. C5a est 100 fois plus active que C3a, elle-même 100 fois plus que C4a. Toutefois, les anaphylatoxines sont rapidement clivées in vivo par une enzyme plasmatique, la carboxypeptidase N qui les convertit en la forme désarginée, nettement moins active.

C3a et C5a ont un bon nombre de propriétés biologiques en commun, à savoir la contraction des muscles lisses, la libération d'histamine, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'accroissement de l'adhérence aux endothéliums des leucocytes, l'agrégation de ces cellules et des plaquettes.

La **C5a** seule est douée de puissantes propriétés **chimiotactiques** pour les leucocytes, les attirant au niveau du foyer inflammatoire.

Les anaphylatoxines ont de plus un rôle **immunorégulateur** : C3a déprime l'immunité tandis que C5a l'augmente.

Outre les anaphylatoxines d'autres petits produits de clivage ont un rôle dans l'inflammation. Le C2b a une activité "kinine-like" mise en jeu vraisemblablement au cours de l'oedème angioneurotique. Le fragment Ba est chimiotactique. Le C3e mobilise les polynucléaires neutrophiles à partir de la moelle osseuse.

VIII-3 Phagocytose

Par le biais des trois principaux récepteurs (CR1, CR2 et CR3) une particule ou un microorganisme recouverts de C3b ou de ses produits de dégradation sont capables d'adhérence immune (**opsonisation**) aux cellules phagocytaires.

VIII-4 Interactions avec les lymphocytes

De nombreuses cellules immunocompétentes expriment à leur surface des récepteurs du complément. Le complément pourrait ainsi moduler la réponse immunitaire. Des antigènes, libres ou sous forme de complexes immuns, recouverts de C3b ou C3bi, peuvent être présentés par les cellules folliculaires dendritiques et stimuler les lymphocytes B via le complexe CD19-CD21-CD81 (cf cours *Lymphocyte B, V-1-5-1*).

VIII-5 Interactions avec les globules rouges

Nous avons vu l'importance du CR1 des erythrocytes dans le phénomène de clairance des complexes immuns.

VIII-6 Complément et VIH

Il a été montré que le virus de l'immunodéficience humaine (**VIH**) est capable d'activer le complément soit de manière directe, soit de manière indirecte après action d'anticorps spécifiques. Le dépôt sur l'enveloppe virale de fragments du C3 qui résultent de cette activation augmente la dissémination et l'infectivité du virus.

Après liaison de la sous-unité gp120 du virus au récepteur CD4 du lymphocyte, la sous-unité gp41 du complexe gp160 devient capable de se lier au C1q de manière indépendante des anticorps et d'enclencher ainsi l'activation du complément par la voie classique. Le dépôt de C3b sur la gp120 qui en découle est augmenté en présence de la MBP. Le VIH est aussi capable d'activer la voie alterne en fonction de la quantité d'acide sialique exprimé à la surface du virus .

Le dépôt de produits de clivage du C3 sur l'enveloppe virale facilite les interactions de cette dernière avec les cellules exprimant des récepteurs spécifiques. Il est important de rappeler que les lymphocytes T sanguins et les thymocytes expriment respectivement le CR1 et le CR2 pour 15 et 40 % des premiers et 25 et 70 % des seconds.

Pour les cellules de la lignée monocytaire/macrophagique qui outre le CR1 et le CR3, expriment faiblement le CD4 et qui sont connues comme le réservoir de virus chez les séropositifs le même phénomène d'infection indépendante du CD4 a été observé.

Sur le plan thérapeutique l'adjonction d'inhibiteur de l'activation du complément pourrait être une approche complémentaire à la stratégie anti-retro-virale actuelle.

VIII-7 Autres fonctions du complément

Le complément est capable par ses composés précoces de la voie classique (C1, C4, C2) de neutraliser certains virus. Il intervient aussi pour solubiliser les complexes immuns. Enfin il existe de nombreuses interconnections avec le système de la coagulation, notamment par le biais du C1-inh.

L'ensemble de ces fonctions explique la place importante que joue le complément dans la réaction inflammatoire. Son rôle ne se limite pas qu'à la lyse par le MAC : il intervient dans la régulation de la réponse immunitaire.

Les pathogènes ont développé plusieurs types de stratégies pour échapper à l'attaque par le complément ou pour détourner à leur profit sa machinerie :

- nous avons vu les trois pathogènes (EBV, rougeole et E.coli) qui utilisent un récepteur du complément comme porte d'entrée.

- certaines mycobactéries sont capables de fixer sur leurs parois, résistantes à l'attaque du MAC, du C2a : elles peuvent alors cliver le C3. Le C3b déposé leur sert alors de sésame pour envahir les phagocytes via le CR1.

- un parasite, le shistosome, possède une protéine membranaire proche du CD59 humain, qui lui permet de prévenir l'assemblage du MAC à sa surface.

- le même parasite est capable en outre d'adsorber le DAF humain à sa surface, et ainsi de prévenir la formation de C3-convertase.

RESUME

L'activation des différents composants du complément se fait en cascade. La conséquence de l'activation est donc l'apparition de différents produits de clivage biologiquement actifs capables d'interagir avec de nombreux types cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

On lui décrit une voie classique, une voie des lectines, une voie alterne, une voie effectrice commune et un groupe de protéines régulatrices.

La voie classique est activée par certains anticorps liés à leur antigène spécifique. La voie des lectines est activée par certains sucres des parois bactériennes. La voie alterne est activée directement par certains polysaccharides bactériens en l'absence d'anticorps.

Ces deux cascades enzymatiques, reliées entre elles, aboutissent au clivage du C3, événement clé du système complémentaire : un troisième groupe de protéines plasmatiques s'assemble alors dans les structures membranaires (voie effectrice commune aboutissant au complexe d'attaque membranaire [MAC]) entraînant des lésions lytiques des doubles couches lipidiques membranaires.

A l'exception de la lyse cellulaire due à l'action directe du MAC sur les membranes plasmiques, toutes les autres actions du complément passent par des interactions fractions du complément/récepteurs ou accepteurs.

Par leur intermédiaire le complément remplit de nombreuses fonctions biologiques importantes :

- prise en charge et dégradation des complexes immuns.
- régulation de la réponse immunitaire.
- intervention dans les réactions de défense par une reconnaissance pré-immune des microbes pathogènes et des cellules altérées de l'hôte, par sa participation à la réponse inflammatoire qui vise à retarder la dissémination de l'infection, par sa participation au phénomène d'opsonisation facilitant la phagocytose et la lyse des agents pathogènes.

Ce système biologique complexe est composé de 23 protéines plasmatiques et d'au moins 10 protéines de surface. Les protéines plasmatiques sont très différentes de par leur taille (24 à plus de 500 kD), leur charge (migration des 9 au 1 globulines), leur concentration plasmatique (de 0,1 à plus de 100 mg/dl). Elles représentent à elles toutes, plus de 25 % des globulines plasmatiques.

L'activation du complément, qui est indispensable à l'apparition de ses activités biologiques, peut se faire soit en phase fluide, soit au contact de surfaces activatrices et aboutit à la formation de complexes enzyme-substrat ou protéine-protéine. La propriété fondamentale de ce système est sa capacité de passer de la phase fluide, où il circule sous forme potentiellement réactive, à la phase solide, par activation d'un site de liaison dont le délai bref de réactivité limite au micro-environnement immédiat du site d'activation les conséquences de cette dernière.

La régulation de ce système biologique hautement performant et donc potentiellement dangereux doit être très précise et très efficace. Ceci est réalisé physiologiquement par l'action conjointe de trois mécanismes :

- la très grande spécificité des enzymes ou des interactions protéine-protéine.
- la demi-vie très courte des complexes multimoléculaires.
- et surtout l'existence de protéines régulatrices plasmatiques ou membranaires hautement spécifiques qui se répartissent en trois catégories : des inhibiteurs sériques qui préviennent l'activation en phase fluide ; des régulateurs qui diminuent ou augmentent l'action du complément contre ses cibles ; enfin des inhibiteurs membranaires qui protègent les cellules contre une agression par le complément autologue.

Ce contrôle a pour but :

- de limiter la quantité de composants activés par un stimulus donné.

- de protéger les cellules de passage (cellules du soi) tout en focalisant l'activation du complément sur les cellules cibles.
- de contrôler la production des fragments biologiquement actifs du complément, capables de modifier les réponses inflammatoire et immunitaire.

POUR EN SAVOIR PLUS:

CHEVAILLER A Le complément in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 : 249-270

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997: 339-57

MECHARELLI-HALBWACHS L Le complément in BACH JF *Traité d'Immunologie* Flammarion Paris 1993: 379-406

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1995: 77-84

TESTEZ-VOUS

🗁 - Les propositions suivantes concernent le système du complément:

A - La voie classique d'activation est, dans l'évolution animale, la plus archaique
B - Le constituant principal, C3, est à la concentration moyenne de 500 mg/dl
C - Le complément permet l'opsonisation de certains microbes
D - La sous-classe IgG2 ne fixe pas le complément par la voie classique
E - Le complément est thermostable

🗁 - L'activation par la voie classique du complément débute par :

A - la production de la C1 estérase
B - l'activation du C1r
C - la fixation du C1q
D - le clivage de C3
E - la fixation du facteur B

🗁 - Les propositions suivantes concernent le système du complément :

A - La voie alterne d'activation est, dans l'évolution animale, la plus archaïque
B - est mis en jeu spécifiquement par l'antigène
C - Le complément permet l'opsonisation de certains microbes
D - La sous-classe IgG3 ne fixe pas le complément par la voie classique
E - Le complément est thermolabile

🗁 - Parmi ces affirmations suivantes quelle(s) est (sont) celle(s) qui est (sont) exacte(s):

A: Le sodium n'intervient que dans la voie classique d'activation du complément
B: Le magnesium est nécessaire aux deux voies d'action du complément, classique et alterne
C: Le calcium est indispensable à la liaison du facteur B au composant C3
D: Le magnésium est indispensable à la liaison du composant C2 au composant C4b
E: Le calcium est nécessaire à la liaison du C8 au complexe C5b67

🗁 - Parmi ces affirmations suivantes quelle(s) est (sont) celle(s) qui est (sont) exacte(s):

A: La C3-convertase classique est le complexe bimoléculaire C3bBb
B: Chez l'homme les gènes des quatre composants des deux C3-convertases sont codés sur le même chromosome
C: Le magnésium est indispensable à la cohésion des deux C3-convertases classique et alterne
D: Les C3-convertases clivent l'extrémité C-terminale de la chaîne 9 du composant C3
E: Le C3a, produit de clivage du C3 par les C3-convertases, est une anaphylatoxine

🗁 - Parmi ces différentes protéines du système du complément, quelle(s) est(sont) celle(s) dont le gène est codé au sein de la région RCA ("regulator of complement activation") sur le bras long du chromosome 1 et qui présente(nt) une homologie de structure (répétition de domaine de 60 acides aminés appelé SCR):

A: Decay Accelerating Factor (DAF)
B: Facteur I
C: Facteur H
D: CR 1 (récepteur du complément de type 1)
E: CR 3 (récepteur du complément de type 3)

🗁 - Parmi ces affirmations suivantes quelle(s) est (sont) celle(s) qui est (sont) exacte(s):

A: Le ligand du CR 1 (récepteur du complément de type 1) est le composant C3b
B: Les récepteurs du complément CR 1 et CR 2 sont des hétérodimères appartenant à la famille des intégrines
C: Le virus d'Epstein-Barr peut infecter les lymphocytes B après liaison au CR 2
D: Le récepteur du complément CR 3 permet la clairance des complexes immuns par les érythrocytes
E: La principale activité biologique qui résulte de la liaison de particules ou de microrganismes recouverts de C3bi au récepteur CR 4 est la phagocytose

Tableau 1

LES PROTÉINES DU COMPLÉMENT

	Symbole	Poids moléculaire (dalton)	Concentration sérique (mg/l)	Nombre de chaînes	Localisation chromosomique (numéro)	Polymorphisme génétique	Produit de clivage
Voie classique	C1q	400 000	60-80	18 (6 × 3)	1		–
	C1r*	85 000	30-50	1	12	–	Chaînes A et B
Activation	C1s*	80 000	30-40	1	12	–	Chaînes A et B
	C4	200 000	200-600	3	6	–	C4a, C4b
	C2*	110 000	10-30	1	6	–	C2a, C2b
Régulation	C1-inh	105 000	180-240	1	11		–
	C4-bp	570 000	250	7	1	–	
	I*	88 000	35	2	4	+	–
	D4F (CD55)	70 000	?	1	1		–
	MCP (CD46)	45-70 000	–	1	1	–	–
	CR1 (CD35)	160-290 000	–	1	1	+	–
Voie alterne Activation	C3	190 000	1 000-1 500	2	19	+	C3a, C3b, C3c, C3d, C3e
	B*	90 000	200	1	6	+	Ba, Bb
	D*	24 000	?	1	?		–
Régulation	P	170-280 000	20-25	3 à 6	X	–	–
	H	150 000	350-550	1	1	–	
	I*	88 000	35	2	4	–	–
	D4F (CD55)	70 000	?	1	1		–
	MCP (CD46)	45-70 000	–	1	1	–	–
	CR1 (CD35)	160-290 000	–	1	1	+	–
Voie finale	C5	190 000	75-80	2	9	–	C5a, C5b
	C6	130 000	60-80	1	5	+	
	C7	120 000	55-60	1	5	+	–
Activation	C8	151 000	55-60	3	1 (α β) 9 (γ)	+	–
	C9	71 000	60	1	5	–	–
Régulation	Protéine S	80 000	500	1	?	?	
	Clustérine	70 000	?	?	?	?	
	C8bp	65 000		1	?	?	–
	HRF20 (CD59)	18-20 000	–	1	11	?	–

* Protéine à activité enzymatique.

LE RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DU LYMPHOCYTE T

I - INTRODUCTION

II - LE TCR 99

II-1 La molécule TCR

II-2 Les gènes du TCR

II-3 La diversité du TCR

II - 4 Structure cristallographique du TCR

III - LA MOLECULE CD3

IV - LES MOLECULES CO-RECEPTRICES CD4 ET CD8

IV-1 La molécule CD4

IV-2 La molécule CD8

V - LES MOLÉCULES CD1

VI- L'ACTIVATION DU LYMPHOCYTE T

VII - LE TCR 11

LE RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DU LYMPHOCYTE T : OBJECTIFS

Niveau A :

- **Deux types de TCR $\alpha\beta$, $\gamma\delta$**
- **Domaine constant, variable**
- **CD3 multicaténaire : signalisation, transport**
- **Mécanismes de la diversité**
- **Comparaison TCR/BCR : protéine, gènes**
- **Kinase : ZAP-70**
- **RestrictionCD4/classe II, CD8/classe I**
- **Fonction de CD1**

Niveau B :

- **sous-groupe de variabilité**
- **ordre de réarrangement**
- **structure cristallographique**
- **chaînes de CD3**
- **structure et kinase associée à CD4, CD8**
- **TCR$\gamma\delta$: définition, fonctions**

LE RECEPTEUR POUR L'ANTIGENE DU LYMPHOCYTE T

I - INTRODUCTION

Nous rappelerons que le TCR est l'immunorécepteur exprimé à la surface du lymphocyte T (voir cours immunorécepteur et cellues de l'immunité), cellule qui supporte l'immunité cellulaire.

Le mode de fonctionnement du lymphocyte T, à savoir la **restriction par le CMH** et la nécessité d'une **CPA,** conditionne l'architecture moléculaire de son immunorécepteur.

II - LE TCR 9 9

II-1 LA MOLÉCULE TCR

L'identification du TCR a longtemps été gênée par l'absence de forme soluble, et donc, par opposition aux Ig, par l'absence de pathologie lymphoprolifération monoclonale s'accompagnant de l'excrétion d'une grande quantité d'immunorécepteur entier ou partiel comme cela peut être le cas dans le myélome. Elle a pu se faire grâce à l'obtention d'anticorps clonotypiques, appelés ainsi car dirigés spécifiquement contre des clones de lymphocytes T et capables de reconnaître à leur surface une molécule de reconnaissance spécifique de chaque clone. On peut ainsi en évaluer la densité à environ 30 000 molécules de TCR par lymphocyte T.

C'est surtout des progrès de la biologie moléculaire que sont venues les connaissances sur le TCR dans le courant des années 1980. Les gènes des quatre chaînes sont désormais bien localisés :

- chaîne 9 : chromosome **14 q 11.2**
- chaîne 9 : chromosome **7 q 35**
- chaîne 1 : chromosome **7 p 15**
- chaîne 1 : chromosome **14 q 11.2**

La particularité est la localisation du locus 1 au sein du locus 9, entre les gènes V9 et les gènes J9 : la conséquence en est que tout réarrangement du gène 9 élimine le locus 1.

Chaque molécule de TCR est un **hétérodimère** associant deux chaînes, 9 et 9 ou 1 et 1, dont les structures répondent à un schéma commun : il s'agit de glycoprotéines de membrane, de poids moléculaire compris entre 40 et 50 kD, réunies par un pont disulfure et comportant trois portions :

-une portion extra-cellulaire,
-un segment transmembranaire
-et une courte portion intra-cytoplasmique.

Tout comme pour les immunoglobulines, les deux chaînes des hétérodimères, 99 et 11, participent à la formation du site de reconnaissance du complexe peptide-CMH.

La portion **extra-cellulaire** est constituée de **deux domaines** présentant une homologie avec ceux retrouvés dans les immunoglobulines : le TCR appartient donc à la **superfamille des immunoglobulines**. De l'extrémité N-terminale vers la membrane cytoplasmique on décrit une **région variable**, avec 3 régions hypervariables (**CDR1, CDR2** et **CDR3**) analogues à celles retrouvées dans la région V des chaînes des immunoglobulines, une **région constante** et une très courte région **charnière** où se fait la liaison covalente entre les deux chaînes. On retrouve un groupement prosthétique polysaccharide par domaine, soit 4 au total par TCR.

La particularité du segment **transmembranaire** est de posséder des **acides aminés chargés positivement** : 2 pour les chaînes 9 et 1, 1 pour les chaînes 9 et 1. Ces acides aminés vont interagir avec des acides aminés de charge opposée des chaînes 1, 1 et 1 de la

molécule CD3 pour assurer le maintien de la cohésion du complexe multi-moléculaire TCR-CD3.

La portion **intra-cytoplasmique** est très courte puiqu'elle ne compte que **5** acides aminés.

II-2 Les gènes du TCR

La même mécanique recombinatoire permet, à partir de fragments de gènes éclatés, d'obtenir la diversité tant du BCR que du TCR.

Par analogie on peut assimiler les gènes des chaînes 9 et 1 à ceux des **chaînes légères** des immunoglobulines puisqu'ils ne possèdent que des gènes V et des gènes J.

Par contre les gènes des chaînes 9 et 1 sont comparables à ceux des **chaînes lourdes** puisqu'ils possèdent trois types de gènes : des gènes D en plus des gènes V et des gènes J.

L'obtention d'une région V est donc le résultat d'un réarrangement V-J pour les chaînes 9 *et* 1*, et de deux (D-J puis V-DJ) pour les chaînes* 9 *et* 1*. On dénombre environ 42 gènes V*9 *et 61 gènes J*9 *ce qui est beaucoup plus pour ces derniers comparativement aux gènes J*1 *ou J*1*. Le locus TCRB s'étend sur 685 kb et comprend 62 à 65 gènes V*9 *dont 47 sont fonctionnels et appartiennent à 24 sous-groupes, 2 gènes D*9 *et 14 gènes J*9*, répartis en deux groupes d'un gène D*9 *et sept gènes J*9 *associés à un gène C*9*.*

Eu égard à l'absence de formes sécrétées du TCR et d'isotype attenant, le nombre de régions constantes est très limité : 1 seul C9 et 2 C9 répartis en tandem dans deux groupes associant 1 gène D9, 7 gènes J9 et 1 gène C9. Chaque gène C comporte 3 exons : un codant pour le domaine constant, un codant pour la courte région charnière immédiatement sus-membranaire et un dernier pour les portions transmembranaire et intra-cytoplasmique.

Le nombre de gènes pour chacun des gènes des différentes chaînes du TCR est donc :

chaîne	9	9	1	1
V	42	47	6	8
D	0	2	0	2
J	61	14	5	3
C	1	2	2	1

La diversité est moindre pour le TCR 11.

*On ne dénombre que six gènes V*1 *et 5 gènes J*1 *d'une part, et 8 gènes V*1 *associés à 2 gènes D*1 *et 2 gènes J*1*. On retrouve par ailleurs le même nombre restreint de régions constantes : un seul gène C*1 *et 2 gènes C*1*. Le répertoire limité du locus* 1 *peut être en partie compensé par l'utilisation de certains gènes V*9*, vu la localisation du locus* 1 *au sein du locus* 9*.*

II-3 La diversité du TCR

Elle s'explique par les mêmes mécanismes de recombinaison génétique que ceux opérant pour les gènes des immunoglobulines (voir ce cours) : il est vraisemblable que les enzymes impliquées (recombinases, ligases, endonucléases) sont communes aux deux lignées. Leur absence est la cause d'un déficit immunitaire combiné sévère (**scid** pour "severe combined immunodeficiency"), caractérisé par l'absence de lymphocytes B et T.

Les réarrangements des gènes d'Ig et du TCR se déroulent préférentiellement en phase G1 du cycle cellulaire. Le contrôle de la recombinase permet de s'assurer que ne progressent dans le cycle cellulaire que les lymphocytes qui ont accompli un réarrangement fonctionnel.

Dans le lymphocyte T,seul le locus TCR est accessible aux recombinases RAG1 et RAG2, au stade précoce pour le locus TCRB, au stade intermédiaire pour le locus TCRA.

Chaque réarrangement fonctionnel inhibe les réarrangements sur l'autre chromosome (exclusion allélique) sauf pour le locus 9 (expression possible de deux chaînes 9 différentes associées à une même chaîne 9 sur le TCR d'un lymphocyte T).

Les mêmes règles d'appariement entre séquences heptamère et nonamère déjà évoquées pour les gènes des immunoglobulines ont cours pour ceux du TCR. L'existence d'un espaceur de 23 paires de base en 3' des gènes V et en 5' des gènes J associée à celle d'un espaceur de 12 paires de base de part et d'autre des gènes D rend impossible, selon la ***règle dite 12/23****, tout appariement V-V, D-D, J-J, ou V-J à l'exception de liaison D-D possibles pour la chaîne* 1. *Bien que théoriquement possible, eu égard à l'insertion de locus* 1 *au sein du locus* 9 *sur le chromosome 14, il n'a jamais été observé de réarrangement V*9*-D*1. *La possibilité de transcription selon trois cadres de lectures pour chaque gène D augmente la diversité.*

Trois des quatre mécanismes évoqués dans la genèse de la diversité des immunoglobulines sont retrouvés dans celle du TCR : **recombinaison génétique (diversité recombinatoire)**, **diversité N** et **appariement de deux chaînes**. Seule manque l'existence de mutations somatiques.

La diversité combinatoire du TCR $\alpha\beta$ *est estimée à* $5x10^6$*, soit 10 fois moindre que celle des Ig. Par contre la diversité jonctionnelle est plus élevée.L'essentiel de la diversité est focalisé sur la région CDR3. L'existence d'un grand nombre de gènes J (61 pour* 9*, 14 pour* 9*) et la possibilité de lecture des gènes D selon trois cadres compensent le faible nombre de gènes V et de gènes D et permet environ* ***3 000*** *appariements possibles pour chaque région V. Cette diversité est là aussi amplifiée par l'ajout possible de nucléotide par l'enzyme terminal déoxynucléotidyl transferase (****TdT****) qui est active non seulement pour les gènes* 9 *mais aussi pour les gènes* 9 *alors que dans la lignée B elle n'est opérationnelle qu'au stade de réarrangement des chaînes lourdes.*

Bien qu'en nombre absolu les gènes V des chaînes 9 et 9 du TCR soient largement inférieurs à ceux des immunoglobulines ils sont regroupés en **sous-groupes de variabilité** qui, eux, sont plus importants comparativement à ceux des immunoglobulines : on dénombre 29 sous-groupes de V9 et 24 sous-groupes de V9.

*Certains de ces sous-groupes sont préférentiellement retrouvés sur les lymphocytes T auto-réactifs de patients souffrant de maladies auto-immunes, maladies au cours desquelles le système immunitaire de l'individu se retourne contre les propres constituants du soi et dans lesquelles il est donc fait un usage biaisé des V*9*.*

Comme pour les gènes des immunoglobulines il existe un **ordre** séquentiel de survenue des réarrangements des gènes du TCR : d'abord 1 puis 1, puis 9 et enfin 9. Il est fréquent de retrouver des loci 1 réarrangés, non exprimés, dans le génome des lymphocytes T à TCR99. Par construction comme nous l'avons déjà signalé il ne peut y avoir de réarrangement 1 puisque ce dernier locus est forcément délété lors de tout réarrangement 9.

L'absence d'intervention de mutations somatiques, dans la création de la diversité du répertoire T, comparativement au répertoire B, où ce mécanisme intervient dans la maturation d'affinité des anticorps, peut s'expliquer par au moins trois raisons : toute mutation en périphérie, après que le lymphocyte T ait passé avec succès les étapes de sélection positive et négative que nous allons détailler prochainement est susceptible d'une part de faire perdre la capacité de reconnaissance du CMH, et d'autre part de faire réapparaître la capacité de reconnaître des auto-antigènes. Ces deux événements contrecarreraient les effets de la différenciation thymique en créant, soit un lymphocyte T inopérant, soit un lymphocyte T dommageable car auto-réactif. Enfin la pression de sélection par l'antigène qui opère sur le lymphocyte B pour obtenir la maturation d'affinité des anticorps n'a pas lieu d'être pour le TCR qui n'a pas vocation à être sécrété.

Pour conclure la comparaison du TCR et du BCR tant au niveau des gènes que des protéines, est résumée dans le tableau ci-dessous:

	Ig	TCR
nombreux VDJ, peu de C	oui	oui
réarrangement VDJ, VJ	oui	oui
site de liaison: appariement V	oui	oui
hypermutations somatiques	oui	**non**
forme transmembranaire	oui	oui
forme sécrétée	oui	**non**
isotypes (fonctions différentes)	oui	**non**
chaînes	4	2
valence	2	1
origine	moelle	thymus

II - 4 Structure cristallographique du TCR

Ce n'est que depuis peu (1996) que deux cristaux de TCR99, l'un murin et l'autre humain, ont été obtenus. Les enseignements tirés de leur étude sont les suivants.

*Les TCR sont orientés en position diagonale par rapport au peptide logé dans le sillon des molécules du CMH. Les boucles hypervariables ou CDR de chacune des chaînes sont regroupées et interagissent soit avec le peptide, soit avec la molécule présentatrice du CMH. Les **CDR1** et **2** des chaînes 9 et 9 sont positionnées **latéralement** alors que les **CDR3** 9 et 9 occupent une position plus **centrale**. Les premiers interagissent avec les hélices 9 de la poche de la molécule du **CMH**, alors que les seconds font contact avec le **peptide** : CDR3 9 avec les acides aminés centraux du peptide, CDR3 9 avec ceux de la partie C-terminale. Les résidus du TCR sont en contact avec des régions relativement conservées entre molécules de classe I et II du CMH.*

Ces études de cristallographie ont permis d'identifier une quatrième région polymorphe, située après le CDR3, et dénommée **HV4** (pour hypervariable) : les régions HV4 9 et 9 sont disposées sur les côtés, très exposées aux solvants et ne sont donc pas en contact avec le site antigénique. Ceci confirme les résultats sur l'implication de la région HV4 9 dans l'interaction du TCR avec les **superantigènes**.

Ces données récentes de cristallographie ont donc confirmé la ressemblance du TCR à un Fab d'immunoglobuline, en précisant notamment les interactions respectives des différents CDR. Ce dernier doit reconnaître le complexe formé par le peptide antigénique présenté par la molécule du CMH. On se le représente comme une tasse peu profonde dont les bords sont formés par les deux premières régions hypervariables (CDR1 et CDR2) qui interagissent avec la molécule du CMH, et plus particulièrement les hélices 9 formant les bords de la poche recevant le peptide. Le fond de la tasse est formé par la troisième région hypervariable (CDR3) qui se lie au peptide.

III - LA MOLECULE CD3

La portion intra-cytoplasmique des chaînes du TCR ne comprend que 5 acides aminés et est donc trop courte pour transmettre le signal d'activation consécutif à la liaison du peptide antigénique. Comme pour le BCR, le TCR est donc associé à un complexe multicaténaire de signalisation, la molécule **CD3**, dont certaines chaînes ont une longue portion intra-cytoplasmique avec des motifs **ITAM** (voir cours immunorécepteurs) constitués d'une séquence d'acides aminés YxxLxxxxxxxYxxL, où Y et L sont respectivement une tyrosine et une leucine et x des acides aminés indifférents. Un tel motif est capable d'activer les tyrosines kinases.

La fonction du CD3 est double : assurer

- la **signalisation**
- le **transport** du TCR à la membrane

Le complexe moléculaire CD3, constitué de chaînes monomorphes, est obligatoirement associé au TCR et est donc présent **sur tous les lymphocytes T** et pour cette raison est un marqueur de différenciation permettant de dénombrer l'ensemble de ces derniers : on dit d'un tel marqueur que c'est un marqueur **pan-T**.

Son utilisation est préférée à celle du CD2, dont le ligand est la molécule LFA-3 (Leukocyte Function associated Antigen 3) ou CD58. Historiquement, avant l'individualisation des anticorps monoclonaux, les lymphocytes T étaient différenciés des lymphocytes B sur leur capacité à former des rosettes avec les globules rouges de mouton (rosettes E, pour érythrocytes). On sait maintenant que le ligand reconnu sur les globules rouges de mouton est la molécule CD58. La plus grande sensibilité de la technique de cytométrie en flux utilisant les anticorps monoclonaux marqués par un fluorochrome, dont les anti-CD2 (voir cours Exploration de l'Immunité II - 2), a permis de se rendre compte que le CD2 n'était pas un marqueur T exclusif, puisqu'il est aussi retrouvé sur les cellules NK (Natural Killer"), avec cependant une plus faible intensité.

Cette molécule CD3 est un assemblage de **5 chaînes** : trois d'entre elles, 1, 1 et 1, possèdent un domaine extra-cellulaire apparenté à ceux retrouvés dans les immunoglobulines. Elles font donc partie de la superfamille des immunoglobulines : 1 et 1 sont glycosylées, alors qu'1 ne l'est pas. Les deux autres, 1 et 1, ne possède qu'une courte portion extra-cellulaire de 9 acides aminés et résulte d'un épissage alternatif du même ARN messager portant sur la région C-terminale. On ne connaît pas de différence fonctionnelle entre ces deux chaînes. La chaîne 1 n'est retrouvée que chez la souris : chez l'homme elle peut être remplacée par la chaîne 1 du récepteur Fc1RI. Les chaînes 1, 1 et 1 ne possède qu'un module ITAM, alors que les chaînes 1 et 1 en possèdent trois. Les principales caractéristiques des chaînes sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	CD31	CD31	CD31	CD31	CD31
PM (kD)	25-28	20	20	16	22
domaine Ig extra-cellulaire	1	1	1	0 (8aa)	0 (8aa)
sucre	2	2	0	0	0
aa intra-cyto	44	44	55	112	154
chromosome	11	11	11	1	1

Le complexe multimoléculaire CD3 associé au TCR est constitué de **3 dimères** : deux hétérodimères 11 et 11 et un dimère 11 ou 11. Les chaînes 1, 1 et 1, dont les gènes sont groupés sur le même chromosome numéro 11q, sont étroitement associées aux chaînes du TCR grâce aux interactions de charges dues à la présence d'acides aminés chargés négativement dans leurs portions transmembranaires répondant à ceux chargés positivement des chaînes du TCR.

Quatre vingt pour cent des lymphocytes ont un homodimère 11 *alors que les 20 % restant possèdent un hétérodimère* 11 *: dans les deux cas les chaînes sont liées de manière covalente par un pont disulfure dans la courte portion extra-cellulaire.*

Outre son rôle dans la transmission du signal d'activation la molécule CD3 intervient dans le **transport du TCR** à la membrane plasmique du lymphocyte. En son absence le TCR est dégradé dans les compartiments intracellulaires de routage des protéines.

La plupart des anticorps monoclonaux anti-CD3 sont dirigés contre la chaîne 1. *La chaîne* 1 *de CD3 peut s'associer avec CD16 à la surface des cellules NK (Natural Killer) et elle présente de fortes homologies avec la chaîne* 1 *du récepteur Fc*1*RI.*

En effet dans le réticulum endoplasmique les chaînes 9 *et* 9 *du TCR sont associées à une protéine chaperonne,* 1*, réalisant des dimères* 91 *et* 91 *pendant que s'associent des hétérodimères* 11 *et* 11 *du CD3. L'étape suivante se passe dans le Golgi où la protéine* 1 *est déplacée par un dimère CD3 aboutissant à la formation de complexes CD3*11*-TCR*9*, CD3*11*-TCR*9*, CD3*11*-TCR*9 *et CD3*11*-TCR*9*. L'appariement entre les chaînes* 9 *et* 9 *du TCR peut alors se faire entre complexes différenciés par les chaînes* 1 *et* 1 *de CD3. La liaison finale au dimère* 11 *(ou* 11*) est la dernière étape indispensable à l'expression membranaire du complexe TCR-CD3 : en son absence il y a dégradation.*

IV - LES MOLECULES CO-RECEPTRICES CD4 et CD8

La particularité de reconnaissance par le lymphocyte T du peptide antigénique en association avec la molécule présentatrice du CMH, phénomène connu sous le nom de **restriction par le CMH**, impose l'existence de co-récepteurs associés au complexe TCR-CD3 capables de distinguer les deux classes d'antigènes du CMH. Les molécules **CD4** reconnaissent la partie invariante des antigènes de **classe II** du CMH alors que les molécules **CD8** reconnaissent la partie invariante des antigènes de **classe I** du CMH.

IV-1 La molécule CD4

Il s'agit d'une glycoprotéine monocaténaire transmembranaire de 54kD dont la portion extra-cellulaire comporte **4 domaines** qui apparentent cette molécule à la **superfamille des immunoglobulines**. Sa portion intra-cytoplasmique peut se coupler à une tyrosine kinase de la famille *src*, produit du gène *lck* et de poids moléculaire 56 kD, appelé $p56^{lck}$.

Par ses deux premiers domaines extra-cellulaires la molécule CD4 est capable de se lier au **domaine** 9_2 de la chaîne 9 de l'antigène HLA de classe II. Rappelons que ce dernier est moins polymorphe que le domaine 9_1 qui lui participe à la formation de la poche de liaison du peptide. La molécule CD4 se lie donc en dehors des sites de liaison de la molécule HLA pour le peptide d'une part et pour le TCR d'autre part. Outre sa spécificité de reconnaissance pour les antigènes HLA de classe II la molécule CD4 augmente la sensibilité du TCR à l'antigène puisqu'elle diminue par un facteur 100 la dose requise d'antigène pour l'activation du lymphocyte T.

*On sait désormais que la molécule CD4, par ailleurs retrouvée en plus faible densité sur les monocytes, sert de récepteur pour le virus de l'immunodéficience humaine (**VIH**) responsable du SIDA. Les lymphcoytes T CD4 sont donc les principales cibles du VIH et leur nombre diminue inexorablement au cours de l'évolution : il en résulte un déficit immunitaire acquis avec des conséquences infectieuses souvent fatales.*

Deux tiers des lymphocytes sanguins expriment le CD4. Ce marqueur est cependant aussi exprimé plus faiblement par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques.

IV-2 La molécule CD8

La molécule CD8 quant à elle est un **hétérodimère** constitué de deux chaînes 9 et 9, liées de manière covalente. De très rares lymphocytes peuvent posséder des molécules CD8 homodimères 99. Ces deux chaînes, 9 et 9, sont des glycoprotéines transmembranaires distinctes mais de poids moléculaire identique (32 kD), possédant un seul domaine extra-cellulaire qui les apparente à la **superfamille des immunoglobulines**. Ce domaine est responsable de liaison des deux chaînes au **domaine** 9**3**, le moins polymorphe, de la chaîne 9 de l'antigène de classe I du HLA. Cette liaison est donc, là aussi, à distance des sites de liaison du peptide et du TCR et permet de diminuer la dose requise de peptide pour l'activation du lymphocyte T par un facteur 100 également.

Un tiers environ des lymphocytes T sanguins porte le marqueur CD8.

Une sous-population de cellules NK exprime plus faiblement le CD8, et sont donc $CD3^{-}CD8^{+}$.

V - LES MOLÉCULES CD1

En plus des antigènes de clase I et II, les TCR 99 sont capables de reconnaître d'autres molécules présentatrices. Ce sont les molécules **CD1**, apparentées aux antigènes de classe I du CMH. Moins polymorphes que ceux-ci, elles sont néanmoins associées avec la 92-microglobuline.

Premier antigène de différenciation décrit sous le nom d'antigène T6, les molécules CD1 existent sous différentes isoformes : CD1a, CD1b, CD1c et CD1d. La chaîne 9, de 43 à 49 kD, qui distingue ces isoformes, possède 2 domaines N-terminaux, 91 et 92, qui forment un sillon analogue au site de liaison peptidique des antigènes de classe I classiques, cependant plus profond, plus étroit et très hydrophobe. Seul le domaine 93, associé à la 92-microglobuline, appartient à la superfamille des immunoglobulines.

On en distingue deux groupes : le **groupe 1** comprend les molécules **CD1a, CD1b et CD1c**, le **groupe 2** n'étant composé que des molécules **CD1d**. Les molécules du groupe 1 sont exprimées à la surface des thymocytes immatures, des cellules dendritiques et de quelques lymphocytes B, alors que le CD1d est exprimé par l'épithélium gastro-intestinal.. Les deux groupes présentent des **glycolipides** dont la nature diffère : d'origine microbienne pour ceux de groupe1 (acide mycolique de la paroi bactérienne de *Mycobacterium tuberculosis* par exemple), du soi pour ceux du groupe 2 (glycosphingolipides tel que l'αgalactosylcéramide). CD1d sert de présentoir aux lymphocytes T γδ et aux cellules NKT (voir cours cellules de l'immunité).

VI - L'ACTIVATION DU LYMPHOCYTE T

L'activation du lymphocyte est le résultat de l'agrégation des TCR par les complexes peptide-CMH qui fonctionnent en cela comme les immunoglobulines de surface. Tout comme elles, ils nécessitent un co-récepteur pour amplifier le signal : pour le TCR les molécules CD4 et CD8 jouent le rôle que le complexe CD19-CD21 (CR2)-CD81 joue pour le BCR.

La transmission de l'information de la membrane au noyau se fait en cascade et fait intervenir des phosphorylations de protéines et la génération de dérivés actifs des phospholipides membranaires. La chaînes 1 *(ou* 1*) de la molécule CD3 est couplée à une protéine kinase produite par le gène fyn, alors que nous l'avons vu les molécules CD4 et CD8 sont couplées à la tyrosine kinase p56* ^{lck}.

Les tyrosines kinases activées sont capables de phosphoryler de nombreuses protéines, au premier rang desquelles on retrouve les chaînes de la molécule CD3. La chaîne CD3 1 phosphorylée est alors capable d'activer une tyrosine kinase particulière, la protéine **ZAP-70** (pour "zeta-associated protein of 70 kD") analogue à la protéine *syk* des lymphocytes B. Tout comme la kinase *fyn*, ZAP-70 est capable d'activer la phospholipase C1 (**PLC**1**)** qui clive le phosphatidyl inositol en diacylglycérol et inositol triphosphate : le premier est responsable de la phosphorylation de la protéine kinase C (**PKC**) capable de phosphoryler d'autres protéines alors que le second augmente le flux de calcium intra-cellulaire. Une autre glycoprotéine de membrane, la protéine **CD45** (ou antigène leucocytaire commun) à activité tyrosine phosphatase, est capable de réguler les tyrosine kinases *fyn* et *lck*.

La conséquence finale de cette activation est la génération de protéines capables de se lier à l'ADN et d'augmenter la transcription de certains gènes par liaison aux séquences promotrices ou amplificatrices ("enhancer"). Citons des facteurs, **NF-**1**B**, **OCT**, **ETS** et plus particulièrement pour le lymphocyte T, le facteur **NF-AT** ("nuclear factor of activation of T cells") qui augmente la transcription du gène de l'interleukine-2 (**IL-2**) dont nous reverrons toute l'importance.

VII - LE TCR 11

La caractérisation de l'ADN codant pour les chaînes 9 et 9 du TCR a conduit à la découverte d'une chaîne distincte 1, dont il a été rapidement démontré qu'elle s'associait à une quatrième chaîne 1 pour former un deuxième type de TCR. Le TCR 11 nécessite également la présence du complexe multimoléculaire CD3 pour être exprimé à la membrane du lymphocyte T et y transmettre son signal d'activation. Comme nous l'avons vu ses gènes présentent la même organisation génomique en segments éclatés, avec la particularité de la localisation du locus 1 dans le locus 9 sur le chromosome 14. La chaîne 1 ne possède que des segments V et J alors que la chaîne 1 possède en outre 2 gènes D. Le petit nombre de ces gènes (6 V1, 5 J1, 8 V1, 2 D1, 3 J1) explique la faible diversité de ce deuxième type de TCR, compensée en partie par une plus grande diversité jonctionnelle.

*L'existence de deux régions constantes C*1*1 et C*1*2 se traduit par deux isoformes de la chaîne* 1*2 en raison de la duplication d'une boucle de 16 acides aminés dans la région charnière qui par ailleurs ne possède pas la cystéine capable d'établir le pont disulfure avec la chaîne* 1 *: le TCR* $1_2$1 *n'est donc pas lié de manière covalente.*

Le ligand du TCR 11 n'est pas encore clairement identifié. Il semble que ce soit principalement des antigènes d'origine bactérienne, notamment issus de mycobactéries. On soupçonne que ce type de TCR reconnaît des peptides présentés non pas par des antigènes HLA classiques, mais plutôt par des antigènes HLA apparentés aux antigènes de classe I, mais beaucoup moins polymorphes tel que le CD1d. Ceci expliquerait l'absence de molécule CD4 ou CD8 associées, dont il n'y aurait pas usage.

Les lymphocytes T TCR11 $CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^-$ ne représentent qu'un infime pourcentage des lymphocytes T sanguins (**1 à 10 %**) : ils ont un tropisme marqué pour certains épithéliums (peau, intestin) sans que l'on ait d'explication formelle à ce phénomène (nature des antigènes reconnus ?). L'étude de la différenciation thymique des lymphocytes T laisse penser que les lymphocytes à TCR 11 et à TCR 99 pourraient venir de deux lignées différentes.

La majorité des lymphocytes à TCR 11 se différencient dans le thymus : ils sont d'ailleurs les premiers à apparaître au cours de l'ontogénie (cf cours sur la *différenciation thymique*).

Eu égard à la spécificité du ligand et à la localisation préférentiellement épithéliale des lymphocytes T à TCR 11 , l'hypothèse actuelle est de faire de cette sous-population particulière une **première ligne de défense muqueuse** vis-à-vis d'agents exogènes.

RESUME

Le récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) est constitué d'un hétérodimère, fait de deux chaînes 1 et 1 ou 9 et 9, associé à un complexe multimoléculaire appelé CD3. Un lymphocyte T donné exprime un TCR d'une spécificité unique, soit un TCR11, soit un TCR99 qui sont d'expression mutuellement exclusive à la surface des lymphocytes T. Le dimère reconnaît l'antigène apprêté en association avec une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) alors que le complexe CD3, invariant, assure la transduction du signal subséquent à cette liaison.

Le TCR ressemble à un Fab d'immunoglobuline (Ig). Ses quatre chaînes appartiennent à la superfamille des Ig. A la différence du BCR, le TCR est monovalent, n'existe pas sous forme sécrétée et nécessite des molécules co-réceptrices (CD4 ou CD8) pour identifier les deux classes de molécules du CMH qui servent de présentoir aux peptides antigéniques.

Chaque chaîne 9, 9, 1 et 1 comporte, dans sa portion extra-cellulaire, une région variable distale et une région constante proximale, dont les structures et les conformations tridimensionnelles sont proches de celle des domaines des Ig. La partie constante, codée par un gène C, peut être subdivisée en trois régions: un domaine globulaire externe stabilisé par plusieurs liaisons covalentes intra-chaîne, une partie transmembranaire hydrophobe avec un ou deux acides aminés chargés positivement impliqués dans des interactions avec des acides aminés chargés négativement des chaînes du CD3 et une courte portion intra-cytoplasmique. Les gènes codant pour la partie variable du TCR, impliquée dans la liaison au complexe peptide/CMH, sont analogues à ceux codant pour les parties variables des Ig. Ce sont des segments V, D et J multiples qui se recombinent pendant la différenciation des lymphocytes T pour produire des gènes VDJ ou VJ fonctionnels. Les loci 9 et 1 ont des segments V et J alors que les loci 9 et 1 ont des segments V, D et J. Les gènes pour les régions D, J et C de la chaîne 9 sont organisés en tandem. Chaque locus est distinct, à l'exception de celui de la chaîne 1 qui est situé entre les gènes V9 et J9. La diversité du TCR est obtenue par : 1) les réarrangements qui sont au nombre de 1 pour les chaînes 9 et 1, et de 2 pour les chaînes 9 et 1, 2) la possibilité de liaison des segments D dans trois cadres de lecture, 3) par l'addition de la diversité N (bases insérées au niveau des jonctions, et qui ne sont pas codées dans la lignée germinale, grâce à l'enzyme terminal déoxynucléotidyltransférase [TdT]). Contrairement aux gènes des Ig, les gènes codant pour le TCR ne sont pas sensibles aux hypermutations somatiques. L'ordre de réarrangement des chaînes est d'abord 1 puis 1, puis 9 et enfin 9, tout réarrangement du locus 9 éliminant le locus 1. La majorité des lymphocytes T expriment un TCR 99. La minorité qui exprime un TCR 11 a un tropisme épithélial et une physiologie particulière.

Le complexe CD3 est constitué de 5 chaînes peptidiques transmembranaires invariantes. Elles sont appelées 1, 1, 1, 1 et 1. Les trois premières possèdent dans leur portion extra-cellulaire un domaine de type Ig, appartenant donc à la superfamillle des Ig et sont associées sous forme de dimères 11 et 11 à un homodimère 11 ou un hétérodimère 11. Les gènes codant pour les chaînes du CD3 ne sont pas soumis à des réarrangements. Leur expression est nécessaire pour l'expression membranaire du TCR. Consécutivement à la liaison du TCR au complexe peptide/CMH, les chaînes du complexe CD3 sont phosphorylées sur des motifs ITAM, réaction initiale de l'activation des lymphocytes T, qui implique plusieurs voies de signalisation par différentes tyrosine-kinases (ZAP-70) aboutissant à l'expression de différents facteurs de transcription (NF-1B, NF-AT).

Les molécules CD4 et CD8, qui toutes deux appartiennent à la superfamille des Ig, sont des molécules aux fonctions analogues qui sont exprimées de façon mutuellement exclusives par les lymphocytes T sanguins matures. Le CD8 est formé de deux chaînes polypeptidiques membranaires liées par des ponts disulfures, qui peuvent reconnaître un site spécifique sur le domaine 93 des molécules CMH de classe I à la surface des cellules cibles. Le CD4 est constituée d'une seule chaîne transmembranaire et reconnaît le domaine 92 des molécules du CMH de classe II sur les cellules présentatrices d'antigène. Ce type d'interaction contribue à la stabilisation du complexe de reconnaissance TCR/peptide/CMH, et transmet, après phosphorylation sur la portion intra-cytoplasmique des co-récepteurs, des signaux d'activation au lymphocyte T.

POUR EN SAVOIR PLUS:

DAERÖN M *Le système immunitaire, ou l'immunité cent ans après Pasteur* INSERM/ Nathan Paris 1995 : 31-62

GARCHAN HJ Le récepteur de l'antigène des lymphocytes T in BACH JF BACH JF, CHATENOUD L *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/science Flammarion, Paris, 2002 : 23-29

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 21-2.

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997 : 184-200

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999 : 40-1.

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2002 : 47-61

TESTEZ-VOUS

🗁 - Le récepteur des lymphocytes T ou TCR:

A - est formé de deux chaînes polypeptidiques, le plus souvent 9:9, plus rarement 1:1
B - est étroitement associé au complexe CD79a/CD79b
C - est codé par les mêmes gènes que ceux des immunoglobulines
D - reconnaît le peptide antigénique présenté par les molécules HLA
E - existe sous forme soluble

🗁 - Le récepteur d'antigène des lymphocytes T :

A - est une immunoglobuline de membrane
B - comporte de la 92-microglobuline
C - est constitué de deux chaînes identiques liées par un pont disulfure
D - comporte deux domaines constants et deux domaines variables
E - reconnaît les antigènes natifs en solution

🗁 - A propos du récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (TCR), quelle(s) est (sont) la (les) proposition(s) exacte(s) :

A - il joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T
B - sa diversité de reconnaissance résulte de réarrangements de plusieurs gènes
C - les fluctuations jonctionnelles ne jouent pas un rôle dans la génération du répertoire
D - ses gènes sont l'objet de fréquentes mutations somatiques
E - son expression nécessite l'expression conjointe de la molécule CD4

🗁 - Le nombre de lymphocytes T dans le sang est de :

A - 50 à 100/mm^3
B - 200 à 400/mm^3
C - 800 à 1000/mm^3
D - 1100 à 1700/mm^3
E - 2000 à 4000/mm^3

🗁 - Un lymphocyte T exprime :

A- un TCR associé au complexe CD79a/CD79b
B - un TCR de spécificité unique
C - un TCR associé soit à une molécule CD3, soit à une molécule CD4, soit à une molécule CD8
D - soit un TCR99, soit un TCR11
E - un TCR de spécificité unique mais 99 et 11

ROLE DU THYMUS DANS LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T

I. INTRODUCTION.

II. LE THYMUS.

III. LES ETAPES DE LA SELECTION THYMIQUE.

III. 1. THYMOCYTES DOUBLE NÉGATIFS $CD4^-$ $CD8^-$

III. 2. THYMOCYTES DOUBLE POSITIFS $CD4^+$ $CD8^+$

III. 3. THYMOCYTES SIMPLE POSITIFS $CD4^+$ OU $CD8^+$

IV. LA LIGNEE DES LYMPHOCYTES A TCR 11.

V. LA LIGNEE DES THYMOCYTES A TCR99.

V.1. ORDRE DE RÉARRANGEMENT.

V.2. LA SÉLECTION POSITIVE.

V.3. LA SÉLECTION NÉGATIVE.

V.4. MÉCANISMES DE LA SÉLECTION POSITIVE ET DE LA SÉLECTION NÉGATIVE.

V. 5. CONCLUSION.

ROLE DU THYMUS DANS LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T : OBJECTIFS

Niveau A :

- **thymus : organe lymphoïde primaire des lymphovytes T**
- **3 stades : DN, DP, SP : défintion**
- **sélection positive, négative : rôles, cellules présentatrices impliquées**
- **TCR :** $\alpha\beta$, $\gamma\delta$
- **chaîne préT**α
- **tolérance centrale : définition**

Niveau B :

- **mise en évidence du rôle du thymus**
- **3 stades : DN, DP, SP : répartition**
- **ordre de réarrangement**
- **marqueurs des précurseurs (CD2, CD5, CD7)**
- **marqueurs des pro-T, pré-T (CD44, CD25, c-kit)**
- **sélection positive, négative : mécanismes**

ROLE DU THYMUS DANS LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T

I INTRODUCTION

Le thymus est l'organe lymphoïde **primaire** dans lequel les précurseurs T, d'origine médullaire, subissent les processus de différenciation qui les conduisent au stade de lymphocytes T matures. Il accomplit en ce sens le même rôle que celui de la moelle osseuse vis-à-vis des précurseurs B. C'est dans un micro-environnement particulier et spécifique à chacun des organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle), par contact cellulaire et sous l'influence de médiateurs solubles, que les précurseurs des lymphocytes vont successivement réarranger les gènes de leur récepteur spécifique de l'antigène (TCR ou immunoglobuline).

La contrainte de la reconnaissance spécifique par le lymphocyte T du peptide présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) impose **deux étapes** propres à l'éducation thymique. Une première étape, dite de **sélection positive**, aboutit à l'élimination des lymphocytes T porteurs de TCR incapables de reconnaître les molécules du CMH de l'individu. Seuls franchissent cette étape les lymphocytes T ayant un TCR capable de se lier aux molécules du CMH et donc capables de participer à la réponse immunitaire cellulaire en permettant les contacts entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Dans un deuxième temps, parmi ces lymphocytes T sélectionnés, ceux capables de reconnaître des peptides auto-antigéniques présents dans le thymus avec une forte affinité sont éliminés. Cette étape, dite de **sélection négative**, aboutit à un état de **tolérance**, qualifiée de **centrale**, car intéressant les peptides auto-antigéniques ubiquitaires, non spécifiques des tissus et exprimés dans le thymus.

Rappelons que cette sélection a un coût élevé, puisque seuls 2 % des précurseurs ressortirons du thymus sous forme de lymphocytes T matures naïfs, exprimant un TCR fonctionnel. Rappelons également qu'une partie des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) est capable de se développer en dehors du thymus.

Le rôle du thymus dans le développement des lymphocytes T a été démontré dès le début des années soixante sur la base d'arguments expérimentaux et d'observations cliniques. Chez la souris la **thymectomie**, ou ablation du thymus, néo-natale entraîne un déficit immunitaire portant sélectivement sur les lymphocytes T. De même il existe une lignée de souris porteuse d'une mutation dite ***nude*** , caractérisée sur le plan phénotypique par une absence de pelage et une agénésie thymique, cause d'un déficit de l'immunité cellulaire par absence de lymphocytes T. L'équivalent chez l'homme a été décrit sous le nom de **syndrome de DiGeorge**, consécutif à une embryopathie qui touche les troisièmes et quatrièmes arcs branchiaux. La conséquence en est une agénésie thymique, une absence de glandes parathyroïdes entraînant une hypocalcémie et de fréquentes malformations des gros vaisseaux du coeur.

II. LE THYMUS

L'embryogénèse et l'anatomie du thymus ont été exposées dans le cours sur "*les organes lymphoïdes".*

III. LES ETAPES DE LA SELECTION THYMIQUE

Rappelons qu'à partir de la cellule souche lymphoïde commune, un embranchement conduit soit à la lignée B, soit aux lignées T et NK. Les cellules NK ne se différencient pas dans le thymus chez l'adulte, mais dans la moelle osseuse.

Les précurseurs des thymocytes qui pénètrent dans le thymus n'expriment à leur surface ni TCR, ni CD3, ni CD4 et ni CD8. Ce sont des cellules blastiques qui vont aboutir en trois stades au lymphocyte T sanguin mature naïf.

Les étapes successives du développement des thymocytes sont marquées par des modifications des marqueurs membranaires qui permettent de distinguer trois stades chronologiques.

Le stade I, ou **double négatif**, comprend des thymocytes qui ne possèdent pas de molécules CD4 et CD8: ils sont dits $CD4^-CD8^-$. Le stade II est composé de thymocytes $CD4^+CD8^+$ ou **double positifs** alors que le stade III comprend deux sous-populations de thymocytes **simple positifs**, $CD4^+CD8^-$ et $CD4^-CD8^+$. Le stade I correspond aux précurseurs observés dans le cortex sous-capsulaire. Le stade II correspond aux petits thymocytes du cortex profond et est un phénotype qui n'est observé **que dans le thymus**. Le stade III correspond au phénotype des cellules matures qui migrent dans la circulation périphérique.

Les réarrangements des chaînes du TCR et l'expression des molécules co-réceptrices CD4 et CD8 se font dans un ordre précis: après les gènes 1 et 1 c'est le gène 9 du TCR qui est réarrangé avant l'expression des molécules CD8 puis CD4, elle-même rapidement suivie par le réarrangement de la chaîne 9.

III. 1. Thymocytes double négatifs $CD4^- CD8^-$

Les précurseurs thymiques n'expriment que des marqueurs de prolifération, tels que le récepteur de la transferrine (CD71) ou la molécule CD38, commune à tous les précurseurs hématopoïétiques, ainsi que le CD34, marqueur des progéniteurs hématopoïétiques et molécule d'adhérence, ligand de la sélectine CD62L en fonction du degré de sulfatation et de glycosylation (voir cours *Organes lymphoïdes, écotaxie : IV - 2 - 1 - 2*).

Ces cellules sont dites doubles négatives, car elles n'expriment ni le CD4, ni le CD8, mais également pas le CD3.

Les thymocytes double négatifs représentent environ **5 %** des thymocytes. Ils sont concentrés dans la **région sous-capsulaire du cortex thymique**.

Au contact du stroma thymique, ces cellules souches vont s'engager irréversiblement dans la lignée T, avec l'apparition des premiers marqueurs T :

- la molécule **CD2** appartenant à la superfamille des immunoglobulines, dont le ligand est la molécule LFA-3 ou CD58, et qui est une voie accessoire d'activation du lymphocyte T.

  CD2 est une glycoprotéine trans-membranaire monocaténaire de 50 kD, appartenant à la superfamille des immunoglobulines avec deux domaines extra-cellulaires de type Ig-like, et une portion intra-cytoplasmique riche en résidus basiques capables de lier des phosphoprotéines et ainsi d'intervenir dans la signalisation. Cependant son principal rôle physiologique est de favoriser les contacts lymphocyte T/CPA (cellule présentatrice d'antigène) et cellules NK/cellule cible.

- la molécule **CD5**, de 67 kD et dont la région extra-cellulaire est constituée de trois domaines de type "scavenger receptor", riches en cystéines.

  Sa portion intra-cytoplasmique contient de nombreux sites potentiels de phosphorylation. Son ligand est le CD72, et qui participe à l'activation du lymphocyte T et à la coopération T-B (voir cours lymphocyte B, IV-3). La phosphorylation du domaine intra-cytoplasmique de CD5 semble dépendre la présence du TCR.

- la molécule **CD7**, de 40 kD et appartenant, elle aussi, à la superfamille des immunoglobulines, mais dont le ligand est inconnu.

C'est un marqueur qui apparaît très précocement au cours de la différenciation leucocytaire, sur des cellules hématopoïétiques pluripotentes. Il disparaît progressivement lorsque les cellules maturent, sauf pour les cellules de la lignée T, sur lesquelles il persiste tout au long des étapes de différenciation, de maturation et d'activation.

Cette population est hétérogène, évoluant en trois étapes d'une cellule pro-T à une cellule pré-T, distinguée par trois marqueurs :

- **CD44** : molécule d'adhérence se liant à l'acide hyaluronique
- **CD25** ou chaîne 9 du récepteur de l'interleukine 2 (IL-2)
- **c-kit**, récepteur du SCF (stem cell factor, voir cours *Lymphocyte B, III - 1*)

Les thymocytes les plus précoces (pro-T) sont c-kit$^+$ CD44$^+$ CD25$^-$ et n'ont pas réarrangés leurs gènes du TCR. Ils passent par un stade c-kit$^+$ CD44$^+$ CD25$^+$ toujours sans réarrangement des gènes du TCR. Puis le thymocyte devient un pré-T qui est c-kit$^-$ CD44$^-$ CD25$^+$ qui réarrange ses gènes 1, 1 et 9 du TCR. A ce stade la cellule exprime un TCR 11 ou 9pré-9 (cf infra), associé au CD3 : il est alors dit double négatif CD4$^-$ CD8$^-$. Ils expriment aussi, de façon temporaire, les marqueurs CD10 et TdT, qui participe pour ce dernier à la génération de la diversité jonctionnelle.

Ce sont ces thymocytes double négatifs qui, perdant leur expression du CD25, vont devenir double positifs, proliférer intensément et subir la double sélection, positive puis négative.

Pour 20 % d'entre eux on retrouve l'expression d'un **TCR** 11 associé à la molécule CD3, qui semble représenter une lignée distincte à ce stade, évoluant pour son propre compte et dont nous reverrons ultérieurement le processus de maturation.

III. 2. Thymocytes double positifs CD4$^+$ CD8$^+$

Ils représentent **85 %** des thymocytes et sont caractérisés par l'apparition de la molécule **CD1** (molécule de la superfamille des immunoglobulines, associée à la 9_2-microglobuline, donc apparentée aux antigènes de classe I du CMH, et fonctionnant comme molécule présentatrice d'antigène glycolipidique car exprimée par ailleurs sur les cellules de Langerhans et certaines cellules dendritiques) et des molécules **CD4** et **CD8**, d'où leur nom. C'est à ce stade que surviennent les réarrangements de la chaîne 9 du TCR.

Cette séquence d'événements aboutit à un thymocyte double positif, exprimant à la fois la molécule CD4 et la molécule CD8 ainsi qu'un TCR 99 ayant une faible affinité pour son ligand (**TCR**99$^{\mathbf{low}}$). Cette cellule va subir la sélection positive au contact des antigènes HLA des cellules épithéliales thymiques du cortex profond. Ces petits thymocytes double positifs qui ont franchi avec succès la barrière de la sélection positive migrent alors vers la médullaire. C'est au contact des cellules dendritiques et des macrophages de la jonction cortico-médullaire qu'ils vont subir la sélection négative. Ces CPA sont capables de présenter des peptides auto-antigéniques par leur antigènes HLA de classe II, sélectionnant ainsi négativement les lymphocytes T potentiellement auto-réactifs qui sont éliminés.

III. 3. Thymocytes simple positifs CD4$^+$ ou CD8$^+$

Les lymphocytes T survivant à cette deuxième étape voient leur densité de TCR augmenter et perdent l'expression d'une des deux molécules co-réceptrices: le résultat en est l'obtention de lymphocytes T simple positifs matures **TCR**99$^{\mathbf{high}}$**CD4**$^{+}$ ou **TCR**99$^{\mathbf{high}}$**CD8**$^{+}$ prêts à être exportés en périphérie.

A ce stade les thymocytes perdent aussi l'expression des marqueurs CD1, CD38 et CD71.

Ils ne représentent que **10 %** des thymocytes.

IV. LA LIGNEE DES LYMPHOCYTES A TCR 11

Nous avons vu que, au cours de l'ontogenèse thymique, le locus 1 était le premier à subir des réarrangements, ce qui laisse supposer l'existence de deux lignées distinctes de lymphocytes, les lymphocytes à TCR11 et les lymphocytes à TCR99. Ces deux lignées se différencient par la **spécificité** de leur TCR respectifs, l'expression différente des **co-récepteurs** CD4 et CD8 et leurs **fonctions différentes**. On ne sait pas bien à quel stade se fait la divergence entre les deux lignées: aucun argument ne permet actuellement de préciser si elle a lieu avant la pénétration des précurseurs dans le thymus ou bien si elle se passe dans le thymus. Les lymphocytes T à TCR 11 ont pour caractéristiques de ne pas exprimer les molécules CD4 et peu ou pas de CD8, de reconnaître les peptides antigéniques présentés par des antigènes HLA de classe I autres que les antigènes HLA-A, -B et -C, d'avoir un **tropisme épithélial** et de ne pas subir de sélection positive et négative dans le thymus. L'existence de régions régulatrices de type "silencer" sur le chromosome 7p15 expliquerait l'absence de transcription du gène de la chaîne 1 dans les lymphocytes T à TCR99, où elles seraient spécifiquement activées. On peut néanmoins observé parfois des réarrangements du locus 1 dans ce dernier type de lymphocytes.

Chez la souris on a observé plusieurs vagues de thymocytes à TCR 11 *ayant des tropismes différents. Chez le foetus les premiers lymphocytes à exprimer un TCR* 11 *fonctionnel ont un réarrangement qui rapproche les différents segments éclatés les plus proches les uns des autres sur l'ADN en configuration germinal, à savoir le gène V*1*5 du gène C*1*1. Cette première vague a un tropisme épidermique. Chez l'embryon la deuxième vague de lymphocytes T à TCR* 11 *possède le deuxième gène V*1 *par ordre d'éloignement du gène C*1*1, à savoir le gène V*1*6. Son tropisme est différent puisque ces lymphocytes colonisent spécifiquement les épithéliums uro-génitaux.*

Chez l'adulte, où le pourcentage de lymphocytes T à TCR 11 circulant est beaucoup plus faible, de l'ordre de **1 à 10 %**, l'usage des différents gènes V1 est beaucoup plus diversifié. Du fait de leur répertoire antigénique restreint et de leur réactivité envers de multiples espèces bactériennes et parasitaires, les lymphocytes T à TCR 11 constituent une première ligne de défense au niveau des portes d'entrée épithéliales des microorganismes pathogènes.

Par analogie avec la lignée B, on peut comparer les lymphocytes T à TCR 11 aux lymphocytes B CD5^{+}. Ce serait deux lignées ancestrales de lymphocytes aux spécificités restreintes et au tropisme épithéliale.

V. LA LIGNEE DES THYMOCYTES A TCR99

V.1. Ordre de réarrangement

Les premiers lymphocytes à TCR99 apparaissent peu de jours après ceux à TCR11 au cours de l'ontogenèse: rapidement ils deviennent la population prédominante.

Tout comme pour les gènes des immunoglobulines il existe un ordre de réarrangement et les mêmes principes de fonctionnement de la mécanique recombinatoire sont utilisés. Le **gène** 9 est réarrangé en **premier**: son expression à la membrane, en association avec une pseudo-chaîne, signale la fin des réarrangements sur le locus 9 et le début de ceux sur le locus 9.

*Le **gène** 9 du TCR est, nous l'avons vu, l'analogue de la chaîne lourde des immunoglobulines: le premier réarrangement rapproche un segment D9 d'un segment J9. L'existence de deux groupes de D9-J9 offre des possibilités de repêchage qui n'existent pas pour les immunoglobulines et explique que le pourcentage final de réarrangements fonctionnels est de 80 % pour la chaîne 9 du TCR alors qu'il n'est que de 55 % pour les chaînes lourdes des immunoglobulines. Le deuxième réarrangement rapproche un segment V9 du DJ9 obtenu. Tout lymphocyte T présentant un réarrangement non fonctionnel meurt par apoptose.*

Après transcription et épissage de l'ARN primaire, la chaîne 9 est exprimée à la surface du lymphocyte T en association avec une glycoprotéine de 33 kD (gp33), produit d'un gène appelé **pré-T**9 localisé sur le chromosome 6. Cette protéine transmembranaire appartient à la **superfamille des immunoglobulines** car elle possède un domaine extra-cellulaire de type Ig-like. Elle se lie à la chaîne 9 par un pont disulfure. Elle remplit des fonctions analogues à celles de la molécule Vpré-B-15, substitut de chaîne légère observé au cours de la différenciation des lymphocytes B.

Ces deux molécules ont pour fonction de s'associer à la chaîne lourde nouvellement produite (9 pour le TCR et µ pour les immunoglobulines) au cours de la première étape du réarrangement. Elle permet l'expression membranaire de celle-ci qui est indispensable à la progression du lymphocyte dans son programme de différenciation. Le complexe chaîne lourde-substitut de chaîne légère fonctionne comme un récepteur, au ligand à ce jour inconnu, dont l'activation signale au lymphocyte la fin des essais de réarrangements sur le locus de la première chaîne (9 ou µ) qui ont été fructueux, et le début de ceux sur le locus de la chaîne suivante (9 pour le TCR et 1 pour les immunoglobulines). Dans le cas du TCR la molécule pré-T9 signale en outre le début de l'expression membranaire des molécules CD4 et CD8. Plusieurs cycles cellulaires surviennent entre la fin des réarrangements du locus 9 et le début de ceux sur le locus 9: ceci permet de multiplier le nombre de lymphocytes TCR9-préT9 de même spécificité, ce qui offre la possibilté à une même chaîne 9 de pouvoir s'associer à plusieurs chaînes 9. Le résultat en est d'augmenter le nombre de lymphocytes T soumis à la sélection positive. L'existence d'environ 50 gènes J9 permet plusieurs tentatives lors des essais de réarrangement V9-J9 et explique que pratiquement tout lymphocyte TCR9-préT9 est capable de réaliser un réarrangement 9 fonctionnel.

L'association d'une chaîne 9 fonctionnelle et d'une chaîne pré-T9, et la production subséquente d'un signal par le pré-TCR ainsi formé a pour conséquence:

- l'arrêt des réarrangements sur la chaîne 9
- l'induction rapide des co-récepteurs CD4 et CD8
- l'inhibition de l'expression de la chaîne pré-T9
- l'activation des réarrangements des gènes 9 du TCR
- et finalement l'expression à la membrane en faible densité du TCR99 associé au complexe CD3.

Une proportion importante de ces thymocytes intermédiaires double positifs expriment le marqueur CD1 et vont être l'objet des processus de sélection du répertoire qui aboutissent à la différenciation terminale en thymocyte mature simple positif.

V.2. La sélection positive

Les prothymocytes qui pénètrent le cortex sous-capsulaire sont des cellules double négatives, $TCR^-CD4^-CD8^-$. Ils migrent dans le cortex qui est le siège d'une intense prolifération. A ce stade les cellules qui ont réussi à réarranger correctement leur TCR sont des thymocytes double positifs exprimant leur TCR en faible densité (**$TCR^{low}CD4^+CD8^+$**). Ils vont alors être soumis au processus de **sélection positive**. Seuls les thymocytes capables de reconnaître, via leur TCR, les antigènes du CMH de l'individu exprimés dans le thymus, vont survivre.

Ceci est prouvé par des expériences de reconstitution par greffe de moelle osseuse chez des souris irradiées à dose létale. L'irradiation détruit entre autre les lymphocytes matures et les précurseurs hématopoïétiques de ces derniers et des CPA. Ceux-ci sont présents dans le greffon médullaire. Lorsque le greffon provient d'une souris hybride F1 d'haplotype CMH^{axb} et que les receveurs sont des parents d'haplotypes CMH^a et CMH^b, les lymphocytes T obtenus après la reconstitution ne prolifèrent et ne répondent qu'à des CPA d'haplotype CMH^a chez le parent receveur d'haplotype CMH^a et d'haplotype CMH^b chez le parent CMH^b. La confirmation du rôle dans la sélection positive du microenvironnement thymique , c'est-à-dire des ***cellules épithéliales corticales****, est apportée par le même type d'expérience de reconstitution chez des souris* nude*: à une souris* nude *F1 d'haplotype CMH^{axb} on greffe un thymus parental de CMH^a. Les progéniteurs T d'haplotype CMH^{axb} existant chez la souris* nude *vont pouvoir se différencier dans le thymus greffé, mais ne reconnaîtront que les antigènes présentés par des CPA d'haplotype CMH^a comme résultat de leur éducation thymique.*

Les thymocytes double positifs dont le TCR ne reconnaît pas avec une affinité suffisante les molécules du CMH exprimées dans le thymus meurent après deux à trois cycles cellulaires. Le faible nombre de molécules différentes de CMH explique la mortalité cellulaire importante observée parmi les thymocytes.

La sélection positive détermine également le type de **co-récepteur** exprimé. Le thymocyte double positif $CD4^+CD8^+$ sélectionné pour son aptitude à se lier à un antigène du CMH perdra sa capacité d'expression du CD8 s'il reconnaît un antigène du CMH de classe II, et à l'inverse, celle du CD4 s'il reconnaît un antigène de classe I.

Ceci a été démontré en suivant la différenciation de thymocytes ayant des transgènes du TCR de restriction connue: la restriction aux antigènes de classe I aboutissait à des lymphocytes T $CD8^+$ et celle aux antigènes de classe II à des lymphocytes T $CD4^+$. Chez les souris dont le gène de la 9_2-microglobuline a été inactivé (invalidation génétique ou souris "knock-out", KO), et qui par conséquent n'expriment pas d'antigènes de classe I du CMH, on ne retrouve que peu de lymphocytes T $CD8^+$. A l'inverse, chez les souris KO pour le gène de la chaîne invariante, qui n'expriment pas d'antigènes de classe II du CMH, ce sont les lymphocytes T $CD4^+$ qui manquent à l'appel.

On observe le même type de résultats avec l'injection à la naissance d'anticorps monoclonaux chez la souris : absence de lymphocytes T CD8 en cas d'anti-classe I, absence de lymphocytes T CD4 en cas d'anti-classe II. En pathologie humaine, dans les très rares cas de déficit immunitaire par absence d'expression des antigènes HLA responsable du syndrome des lymphocytes nus, le défaut d'expression des antigènes de classe I s'accompagne d'une absence de lymphocytes T $CD8^+$ et celui des antigènes de classe II d'une absence de lymphocytes T $CD4^+$.

Cette sélection du co-récepteur se fait en deux étapes. Dans un premier temps, après liaison du TCR à l'antigène HLA, quelle que soit sa classe, l'expression d'un des deux co-récepteurs est diminuée au hasard, aboutissant à deux types de thymocytes double positifs selon le niveau d'expression: ***$CD4^{high}CD8^{low}$*** *et* ***$CD4^{low}CD8^{high}$****. Dans une deuxième étape n'éviteront l'apoptose que les seuls thymocytes dont le TCR et le co-récepteur le plus fortement exprimé seront capables de se lier à la même molécule du CMH, soit par exemple, les thymocytes $CD4^{high}CD8^{low}$ pour un antigène de classe II.*

V.3. La sélection négative.

Après cette première étape de sélection positive qui aboutit à un thymocyte capable de reconnaître comme molécule présentoir de peptides fonctionnelle les antigènes HLA, un deuxième processus de sélection intervient afin d'éliminer ceux des thymocytes double positifs qui sont capables de se lier avec une trop forte affinité aux **peptides auto-antigéniques** présents dans le thymus et présentés par les antigènes HLA des antigènes de classe II des **CPA** que sont les **macrophages** et les **cellules dendritiques**.

Il est à noter que la réponse consécutive à la liaison de l'antigène au TCR aboutit à des résultats contraires en fonction de la nature de l'antigène (exogène ou auto-antigène) et de la localisation de la rencontre (thymus ou périphérie), c'est-à-dire du stade de différenciation du lymphocyte T. On observe une apoptose dans le thymus pour les seuls antigènes qui sont présents, à savoir les auto-antigènes, et une prolifération en périphérie pour les antigènes exogènes.

Cette sélection négative permet d'établir la **tolérance au soi**, et est dite **centrale** car elle ne concerne que les auto-antigènes présents dans le thymus. Nous verrons qu'un mécanisme différent permet d'expliquer la mise en place de la tolérance dite périphérique pour les auto-antigènes non exprimés dans le thymus.

Des expériences de greffe de peau chez des souris chimères permettent d'affirmer que ce sont les CPA qui sont à l'origine de la sélection négative.

Une souris d'haplotype parental CMH^a reçoit, après irradiation létale, une greffe de moelle osseuse issue d'une souris hybride F1 CMH^{axb}. Les lymphocytes T du greffon se différencient et sont sélectionnés positivement au contact d'un épithélium thymique d'haplotype CMH^a. Néanmoins les souris chimères sont tolérantes à une greffe de peau de l'autre parent ayant l'haplotype CMH^b. Ceci implique que les lymphocytes T dont le TCR reconnaît les peptides antigéniques issus des antigènes du CMH^b ont été éliminés dans le thymus. Seules les cellules du greffon médullaire ont pu apporté ces antigènes.

Cette sélection négative peut être mise en évidence dans un modèle murin avec un TCR transgénique spécifique d'un antigène mineur d'histocompatibilité, H-Y, uniquement exprimé dans les cellules mâles, en particulier dans le thymus. Des lymphocytes T exprimant le transgène ne sont retrouvés en périphérie que chez les souris femelles. Chez les mâles, les thymocytes exprimant ce TCR transgènique, auto-réactif, sont éliminés dans le thymus.

*Chez la souris un mécanisme particulier, qui semble opérationnel uniquement dans cette espèce, est responsable pour une part de la sélection négative. Elle fait intervenir des molécules que l'on appelle les **superantigènes**. Ces molécules sont produites par différents microorganismes (mycobactéries, mycoplasmes, virus). Elles ont pour caractéristique de pouvoir se lier de manière non spécifique au complexe TCR-CMH et sont donc incapables, contrairement aux antigènes, de pouvoir conférer une réponse de type anamnestique. Elles sont capables de stimuler de 2 à 20 % des lymphocytes T au cours d'une infection par un microorganisme qui les possède. Contrairement aux antigènes qui nécessitent une dégradation partielle pour être reconnu par les lymphocytes T, ces superantigènes ne peuvent agir que sous une forme intacte. Leur effet stimulant sur les lymphocytes T CD4 aboutit à une production de cytokines qui amplifie la réponse immunitaire et, dans certains cas, peut dépasser son but et être responsable d'états pathologiques: citons les intoxications alimentaires à Staphylocoques dues à une entérotoxine qui est un superantigène et le syndrome de choc toxinique, observé après usage de tampons périodiques, et du à une autre toxine du même germe. Ces superantigènes se lient à la région V9 du TCR et à la face latérale du CMH, en dehors de la poche de liaison du peptide. Certains superantigènes viraux, au cours de l'évolution, ont été intégrés dans le génome de la souris. C'est le cas pour un virus responsable de tumeur mammaire (**MMTV** pour "mouse mammary tumor virus"). Ils ont ségrégé selon les lois de Mendel et sont différemment répartis selon les lignées de souris. Ils codent pour des antigènes identifiés comme des antigènes mineurs d'histocompatibilité (**Mls** pour "Minor lymphocyte stimulating antigen") puisque les lymphocytes T d'une souris n'ayant pas un allèle prolifèrent en réponse aux lymphocytes B d'une souris le possédant. On s'aperçoit que l'expression de ces superantigènes endogènes s'accompagne d'une restriction du répertoire T: ainsi chez les souris $Mls1a^+$ on constate une délétion des gènes V96, V98.1 et V99. Cette délétion survient dans la jonction cortico-médullaire et intéresse le thymocyte double positif qui établit un contact TCR-CMH avec la CPA, quelle que soit la nature du peptide. Les superantigènes viraux induisent, par sélection*

négative, la délétion des thymocytes dont le TCR possède les chaînes 9 *appartenant aux familles d'homologie qui interagissent spécifiquement avec les superantigènes.*

V.4. Mécanismes de la sélection positive et de la sélection négative.

Deux hypothèses permettent d'expliquer que l'interaction entre deux mêmes molécules (le TCR et le CMH) aboutissent à deux réponses différentes selon le stade de la différenciation du thymocyte. En effet, en l'absence d'une telle dichotomie des réponses, tout lymphocyte sélectionné lors de la première étape de sélection positive serait impitoyablement éliminé lors de la seconde, dite de sélection négative.

La première hypothèse fait intervenir des réponses opposées en fonction de l'**affinité** de la liaison TCR-CMH. Lors de l'étape de sélection positive toute interaction du TCR trop faible ou trop forte avec les molécules du CMH conduit à l'apoptose des thymocytes. Seuls survivent ceux dont la liaison aux cellules épithéliales thymiques est intermédiaire. Lors de l'étape suivante de sélection négative la liaison au peptide auto-antigénique est responsable d'une liaison de forte affinité qui conduit là encore à l'apoptose de la cellule. Ce serait donc l'intensité du signal qui serait à la base de la sélection: intermédiaire il permettrait la prolifération et la survie, fort il induirait l'apoptose.

La deuxième hypothèse est dite du **ligand altéré** et postule que l'épithélium thymique présente des peptides qui lui sont propres, donc différents de ceux retrouvés à la surface des CPA du thymus et des organes périphériques.

*La sélection thymique explique pourquoi le **CMH** est **polymorphique** plutôt que polygénique. En effet la réponse immunitaire associe la diversité combinatoire des récepteurs spécifiques de l'antigène (TCR, immunoglobuline) à celle allélique du CMH. Chaque individu possède l'intégralité des répertoires T et B alors qu'il ne possède que quelques antigènes HLA. Le répertoire de ce dernier n'est exprimé intégralement qu'au niveau de l'espèce. Ceci permet, dans une logique darwinienne de sélection, de favoriser la survie de l'espèce au prix du sacrifice de quelques individus: la capacité de présenter un antigène exogène lié à un haplotype HLA donné peut devenir un critère de sélection positif ou négatif (bon répondeur lors d'une infection, ou réaction croisée avec un peptide du soi). Un rapide calcul montre que le chiffre d'environ 15 molécules de CMH différentes exprimées par tout individu est le maximum compatible avec le processus de sélection thymique. En effet l'augmentation de ce nombre conférerait certes des possibilités de présentation plus nombreuses, mais augmenterait aussi d'autant la mortalité cellulaire intra-thymique. On sait qu'environ 5 % des thymocytes reconnaissent un peptide du soi, et donc qu'environ 75 % sont éliminés par 15 molécules de CMH différentes. Au-delà l'avantage d'avoir de nouveaux gènes HLA et donc de nouvelles molécules présentatrices est compensé par l'importance de la mort cellulaire consécutive à la sélection négative.*

V. 5. Conclusion.

Le développement des lymphocytes T nécessite deux étapes de sélection, positive pour la reconnaissance des antigènes du CMH, et négative pour celle des complexes peptides auto-antigéniques-CMH. La première étape est supportée exclusivement par les cellules épithéliales thymiques alors que la seconde l'est par les cellules dendritiques et les macrophages. La sélection positive permet que tous les lymphocytes T matures puissent répondre à un antigène exogène présenté par les antigènes du CMH sur les CPA alors que la sélection négative élimine les lymphocytes T auto-réactifs. Le paradoxe que la reconnaissance du même ligand par le même récepteur conduise à deux effets opposés reste l'un des mystères de l'immunologie que seule pourra expliquer une meilleure connaissance du ligand, du récepteur, des mécanismes du transmission du signal et des variations de ces paramètres en fonction du stade de différenciation.

RÉSUMÉ

Le thymus offre un microenvironnement confiné et structurellement organisé pour le développement des lymphocytes T. Les réarrangements des gènes du TCR y sont induits séparément pour les deux lignées de lymphocytes T , TCR99 et TCR11. Les précurseurs T proviennent de la moelle osseuse et se différencient dans le thymus en passant par différentes étapes qui peuvent être suivies grâce à l'expression différentielle des protéines du complexe TCR-CD3 et des co-récepteurs CD4 et CD8. On distingue trois étapes: thymocyte précoce ou double négatif ($CD4^-CD8^-$), thymocyte intermédiaire double positif ($CD4^+CD8^+$) uniquement retrouvé dans le thymus et thymocyte mature simple positif ($CD4^+$ ou $CD8^+$). Cette différenciation se fait au prix d'une importante mort cellulaire qui vise à éliminer les lymphocytes T inopérants pour la reconnaissance des antigènes HLA comme présentoirs de peptide (sélection positive) et ceux reconnaissant avec une trop forte affinité les peptides auto-antigéniques (sélection négative). La plupart de ces étapes ont lieu dans le cortex et à la jonction cortico-médullaire: la médullaire thymique ne contient que des thymocytes matures.

Ce microenvironnemnt spécialisé sélectionne donc les lymphocytes T à TCR99 qui ont les récepteurs les plus aptes par contact du récepteur et du co-récepteur (CD4 et CD8) avec les antigènes HLA exprimés sur les cellules épithéliales thymiques. C'est également dans le thymus que les CPA originaires de la moelle osseuse éliminent les lymphocytes T capables de reconnaître les auto-antigènes normalement présentés par ces cellules, établissant ainsi la tolérance centrale. Ces deux mécanismes génèrent donc ainsi un répertoire T utile et non toxique.

POUR EN SAVOIR PLUS:

BONNEVILLE M Thymus et développement lymphocytaire T in GENETET N *Immunologie* EMinter 2002 : 89 - 103.

CHATENOUD L. Cellules T in BACH JF *Immunologie : de la biologie à la clinique*. Médecine/science Flammarion, Paris, 1999 : 55-74

DAËRON M *Le système immunitaire, ou l'immunité cent ans après Pasteur* INSERM/ Nathan Paris 1995 : 31-62

HOMBERG JC. *Immunologie fondamentale* Estem, Paris 1999 : 22-5.

JANEWAY CA, TRAVERS P *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999 : 227-260

MALE D *Immunologie: aide-mémoire illustré* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1999

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 2001 : 143-146

TESTEZ-VOUS

🗁 - Les propositions suivantes concernent le thymus. Indiquez celle(s) qui est (sont) exacte(s):

A - Dans le thymus se produit à la fois une sélection positive et négative
B - Les cellules épithéliales corticales thymiques sont impliquées dans la sélection négative
C - Environ 12 % des précurseurs thymiques quittent le thymus sous forme de lymphocytes T matures naïfs
D - Les thymocytes corticaux qui subissent le phénomène de sélection positive sont de phénotype $CD4^+CD8^+$ (double positifs)
E - La chaîne 1 du TCR est la première réarrangée

🗁 - La molécule CD3 est :

A - composée de deux chaînes, α et β
B - un marqueur exclusif des lymphocytes T CD4
C - indispensable à l'activation des lymphocytes qui la portent
D - la chaîne α du récepteur de l'interleukine-2
E - étroitement associée au TCR (récepteur pour l'antigène du lymphocyte T)

🗁 - La sélection positive des thymocytes dans le thymus :

A - s'effectue au contact des macrophages et des cellules dendritiques
B - intéresse des thymocytes simple positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$
C - a lieu dans le cortex thymique
D - intéresse des thymocytes n'exprimant pas encore de TCR
E - sélectionne des lymphocytes capables de reconnaître les antigènes du CMH comme molécules présentatrices

🗁 - Les lymphocytes à TCR 11 :

A - le plus souvent n'expriment pas les co-récepteurs CD4 et CD8
B - n'ont pas de complexe CD3 associé à leur TCR
C - ont un tropisme splénique
D - sont majoritaires dans le sang
E - reconnaissent leur antigène présenté par des molécules HLA de classe I non classique (autres que HLA-A, -B et -C)

🗁 - La tolérance centrale des lymphocytes T :

A - concerne les thymocytes double positifs $CD4^+CD8^+$
B - se fait au contact des macrophages et des cellules dendritiques à la jonction cortico-médullaire thymique
C - élimine les lymphocytes T auto-réactifs
D - est le fruit de la sélection négative thymique
E - est la conséquence de l'apoptose des lymphocytes éliminés

LES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS

I - INTRODUCTION

II - LA PRODUCTION DE LYMPHOCYTES T EFFECTEURS ACTIVES

II-1- Recirculation et activation des lymphocytes T matures naïfs

II-2- Les ganglions lymphatiques

II-3- Activation des lymphocytes T

II - 3.1 - Les molécules d'adhérence
II - 3.1.1. Les sélectines
II - 3.1.2. Les intégrines
II - 3.1.3. Contact lymphocyte T-CPA
II - 3.2. La nécessité du 2ème signal
II - 3.3. Les macrophages
II - 3.4. Les cellules dendritiques
II - 3.5. Les lymphocytes B

II-4- Synthèse de l'interleukine-2 (IL-2) et de son récepteur

II-5- La tolérance périphérique

II-6- L'activation des lymphocytes T effecteurs

III. PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS.

III-1- Proteines de membrane

III-2- proteines secretees

III-2-1 cytotoxines
III-2-2 cytokines

IV. LA CYTOTOXICITÉ T.

IV. 1. Les lymphocytes T cytotoxiques

IV-1-1- Les CTL à TCR99
IV-1-2- Les CTL à TCR 11.

IV-2- CTL et molécules d'adhérence

IV-3- CTL et lyse cellulaire

IV - 3-1 La nécrose cellulaire
IV - 3-2 L'apoptose

IV - 3-3 Cytotoxicité granulaire

IV - 3.3.1. La perforine

IV - 3.3.2. Les granzymes

IV - 3-4 Cytotoxicité membranaire

IV - 3-5 Cytokines et cytotoxicité.

V LES LYMPHOCYTES T CD4$^+$ Th1

V-1- Activation des macrophages

V-2- Délai d'action des lymphocytes T CD4$^+$Th1

V-3- Les macrophages activés

V-4- Les cytokines des lymphocytes T CD4$^+$Th1

V-5- Le granulome inflammatoire

VI- LES LYMPHOCYTES T CD4$^+$ Th2 (voir cours *"Lymphocyte B"*)

LES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS : OBJECTIFS

Niveau A :

- **restriction CMH : CD8/classe I, CD4/classe II**
- **notion de co-signal**
- **définitions des CTl, T helper T_H1, T_H2**
- **sélectines, intégrines, diapédèse**
- **tolérance périphérique**
- **nécrose, apoptose : définition**

Niveau B :

- **B7, CD28, CTLA-4**
- **Granzymes, perforine**
- **Caspases, FasL**
- **Activation des macrophages**
- **granulome**

-

LES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS

I - INTRODUCTION

Une fois sortis du thymus où ils ont acquis le répertoire T et la tolérance au soi grâce aux mécanismes de sélection positive et négative, les lymphocytes T matures naïfs sont exportés dans le reste de l'organisme. Ils vont y patrouiller, recirculant à travers les organes lymphoïdes secondaires via le réseau des lymphatiques et la circulation sanguine systémique à la recherche de leur antigène spécifique. La rencontre avec ce dernier provoque une intense prolifération donnant lieu à une **expansion clonale** c'est-à-dire une multiplication du nombre de lymphocytes T spécifiques de l'antigène, portant donc le même TCR. Elle aboutit, grâce à un mécanisme de différenciation, à la génération de **lymphocytes T effecteurs** et de **lymphocytes T mémoire**.

Ces derniers sont les supports des propriétés anamnestiques de la réponse immunitaire adaptative, expliquant la précocité de cette dernière lors d'une rencontre ultérieure avec le même antigène.

Les lymphocytes T effecteurs, quant à eux, ont pour mission d'éliminer immédiatement l'antigène et se répartissent en plusieurs sous-populations aux caractéristiques phénotypiques et aux fonctions différentes, selon la nature du pathogène qu'ils détectent :

- les **lymphocytes T cytolytiques** ou **CTL** (pour "cytotoxic T lymphocytes"), principalement **CD8**$^{+}$, détectent des antigènes en provenance de pathogènes se multipliant dans le cytosol des cellules où ils rejoignent la voie de routage des antigènes de classe I du CMH. Ainsi présentés par ces antigènes de classe I, ils les signaleront aux CTL dont la fonction est de lyser les cellules infectées.

- les pathogènes qui se multiplient dans les vésicules intra-cellulaires, de même que ceux qui proviennent de bactéries ou de toxines extra-cellulaires phagocytées, rejoignent la voie de routage des antigènes de classe II du CMH, capables de présenter des antigènes digérés à la surface des cellules présentatrices d'antigène professionnelle (CPA) aux **lymphocytes auxiliaires CD4**$^{+}$. Ces lymphocytes T auxiliaires ou "helper" (**Th**) ont pour mission d'aider les autres cellules immunocompétentes. En fonction de leur cellules-cible on distingue deux sous-populations de lymphocytes T auxiliaires : les **Th1** qui agissent sur les macrophages et les **Th2** qui coopèrent avec les lymphocytes B. Cette dichotomie fonctionnelle est supportée par un équipement en médiateurs solubles, ou cytokines, différent (voir cours *cytokines IV-2-1*).

La différence entre les CTL et les lymphocytes T helper repose sur la nature de l'antigène du CMH reconnu et celle de la molécule co-réceptrice associée. Les **CTL** sont restreints par les antigènes HLA de **classe I** et expriment la molécule **CD8**. Les lymphocytes **T helper** sont, quant à eux, restreints par les antigènes HLA de **classe II** et expriment la molécule **CD4**. Les CTL et les lymphocytes Th1 sont impliqués dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire, alors que les Th2 le sont dans la réponse immunitaire à médiation humorale, avec les lymphocytes B.

II - LA PRODUCTION DE LYMPHOCYTES T EFFECTEURS ACTIVES

La génération de lymphocytes T effecteurs actifs nécessite la présence de deux signaux, l'**antigène** et un **co-signal**, que seules sont capables de délivrer les cellules présentatrices d'antigènes (**CPA**) professionnelles. Ces cellules sont localisées dans les

organes lymphoïdes secondaires où a lieu la rencontre du lymphocyte T mature naïf et de son antigène, événement qui aboutit à la sensibilisation initiale (ou "priming") de ce dernier.

II-1- Recirculation et activation des lymphocytes T matures naïfs

Le système immunitaire est constitué de cellules isolées, non attachées entre elles au sein d'une structure anatomique définie. Les lymphocytes migrent isolément de la lymphe vers le sang, et réciproquement. Bien qu'ils soient organisés en structures morphologiquement identifiables au sein des organes lymphoïdes, ils y sont faiblement attachés entre eux. Néanmoins, un lymphocyte isolé nécessite l'aide d'autres cellules pour être activé, pour survivre, pour circuler à travers l'organisme, pour coloniser un tissu, lymphoïde ou non, et éventuellement pour mourir. Des ***contacts*** *cellulaires entre un lymphocyte et son environnement constitué de cellules non lymphoïdes ainsi que des contacts entre deux ou plusieurs sous-populations de lymphocytes sont indispensables à l'établissement d'une réponse immunitaire.*

Trois étapes sont essentielles pour l'élimination de l'antigène : l'acquisition du répertoire par les lymphocytes, leur rencontre avec l'antigène dans un microenvironnement approprié permettant l'expansion clonale des cellules mémoire et effectrices, enfin l'exportation de ces cellules là où elles ont le plus de chance de rencontrer l'antigène. Les organes lymphoïdes secondaires sont situés sur les trajets de pénétration des antigènes. La ***recirculation*** *des lymphocytes est donc un élément capital qui permet d'augmenter la probabilité de rencontre entre un clone de lymphocytes et son antigène spécifique. Cette recirculation pallie à l'impossibilité qu'a l'organisme d'exprimer en tout site et à n'importe quel moment l'intégralité du répertoire immunologique. La compartimentalisation du système immunitaire en organes lymphoïdes primaires, secondaires et tertiaires (autres tissus acquérant des structures lymphoïdes lors de phénomènes inflammatoires chroniques) permet de répondre avec le moindre coût aux impératifs requis pour l'élimination de l'antigène .*

Le passage des lymphocytes du sang vers les organes lymphoïdes secondaires, appelé **diapédèse**, se fait au niveau d'un endothélium spécialisé, cuboïde des veinules post-capillaires (**HEV** : "high endothelial venules"). Il a déjà été étudié dans un cours précédent (*Organes lymphoïdes IV : écotaxie*)

Nous nous contenterons de rappeler que la diapédèse comprend trois étapes. La première est représentée par l'interaction entre une protéine d'adhérence extra-cellulaire (**sélectine**, ou récepteur du homing) d'expression constitutive à la membrane du lymphocyte et son ligand d'expression modulée sur l'HEV. Cette liaison est faible et transitoire, et n'a pour seule fonction que de ralentir le passage des lymphocytes. En l'absence d'activation, qui représente la deuxième étape, susceptible d'induire l'apparition d'une deuxième variété de protéines d'adhérence (**intégrines**) responsables de mécanismes d'adhérence plus forts, qui constituent la troisième étape, on aboutit au relargage du lymphocyte dans le courant circulatoire.

Trois types de cellules présentatrices d'antigène **(CPA)** professionnelles sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires : les **macrophages**, les **cellules dendritiques** et les **lymphocytes B.**

II-2 - Les ganglions lymphatiques

La connaissance de l'architecture du ganglion (cf cours *Organes lymphoïdes III-3)* est nécessaire pour comprendre les contacts qui s'établissent entres les différentes sous-populations cellulaires et qui sont indispensables à la génération et à la modulation d'une réponse immunitaire.

II - 3 - Activation des lymphocytes T

L'activation, mais aussi la migration et les propriétés effectrices des lymphocytes T dépendent de molécules d'**adhérence** exprimées à la surface de différentes sous-populations cellulaires, qui facilitent les contacts entre les cellules indispensables à l'apparition de ces propriétés.

Les interactions spécifiques entre les différentes molécules d'adhérence exprimées sur une cellule comparables à des molécules de domiciliation, et la mosaïque des adressines, assimilables à un code postal, expliquent la spécificité de migration des cellules immunocompétentes. Elle est fonction de l'état de différenciation et d'activation de ces dernières.

II - 3.1 - Les molécules d'adhérence

On distingue trois grandes familles de molécules d'adhérence regroupées selon des homologies de structures : les **sélectines**, les **intégrines** et leurs **ligands** qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les molécules spécifiquement reconnues par ces molécules d'adhérence qui gouvernent la spécificité de migration des cellules sont, pour cette raison, parfois dénommées **adressines**.

II - 3.1.1. Les sélectines

Les sélectines ont une même structure de base avec, dans leur portion extra-cellulaire, un domaine de type lectine, calcium dépendant. Les lectines sont des molécules capables de lier spécifiquement des chaînes carbohydrates. Elles ont été étudiées dans le cours *Organes lymphoïdes IV-2-1*.

On reconnaît trois sélectines selon leur origine. La E-sélectine (**CD62E**) exprimée sur les cellules endothéliales activées par l'IL-1 ou le TNF A ; la P-sélectine (**CD62P**) exprimée principalement sur les plaquettes activées par l'héparine ou l'histamine, mais aussi sur les cellules endothéliales activées de la même façon et la L-sélectine (**CD62L**) d'expression constitutive, à la différence des deux précédentes, sur les lymphocytes.

Le ligand de la L-sélectine est un épitope oligosaccharidique partagé par trois adressines:

- **GlyCAM1** ("glycosylation dependent cell adhesion molecule 1"),
- **CD34**
- **MAdCAM1** ("mucosal addressin cell adhesion associated molecule 1").

II - 3.1.2. Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères membranaires faits de deux chaînes reliées de manière non covalente. La plus lourde est appelée 9, et varie d'une intégrine à l'autre, alors qu'au sein d'une même sous-famille, la chaîne légère, appelée 9, est commune.

L'activation des lymphocytes alors qu'ils sont faiblement attachés aux HEV par l'interaction sélectine-adressine est responsable de l'induction de molécules d'adhérence secondaires beaucoup plus puissantes, capables donc de renforcer la liaison et de favoriser la diapédèse. De telles molécules se retrouvent dans la famille des 9**1 intégrines** ou celle des 9**2 intégrines**.

Elles ont été étudiées dans le cours sur *les organes de l'immunité (IV-2-3)*, auquel nous renvoyons.

Nous ne rappellerons que les caractéristiques des 9**2 intégrines** dans le tableau ci-dessous.

	9	92
LFA-1	CD 11a 180 kD	CD 18 95 kD
CR 3	CD 11b 170 kD	CD 18 95 kD
CR 4	CD 11c 150 kD	CD 18 95 kD

L'absence congénitale de chaîne 92 se traduit par un grave déficit immunitaire responsable d'infections dès la naissance et s'explique par l'absence de cellules phagocytaires opérationnelles. Chez de tels sujets la réponse cellulaire T est normale traduisant une redondance des systèmes d'activation.

A côté des 92 intégrines un autre couple de molécules d'adhérence intervient dans les contacts entre le lymphocyte T et les CPA : il s'agit de la molécule **CD2**, exprimée par le lymphocyte, et son ligand, **LFA-3** ou **CD 58**, exprimé par la cellule CPA. Ces deux molécules appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

II 3.1.3. Contact lymphocyte T-CPA

L'interaction entre le lymphocyte T mature naïf et la CPA est donc médiée par l'interaction entre différents couples de molécules d'adhérence. Ce contact doit permettre au lymphocyte T, via son TCR, de tester les différents complexes peptide-CMH exprimés à la surface des CPA. La reconnaissance du peptide spécifique par le lymphocyte T, c'est-à-dire la bonne congruence de la liaison TCR-peptide-CMH, entraîne un changement conformationnel de la molécule LFA-1 qui se traduit par une augmentation d'affinité pour la liaison à ICAM-1 et un changement dans la nature de cation divalent associé (Mg^{2+} au lieu du Ca^{2+} initial). En l'absence de reconnaissance du peptide la liaison est suffisamment faible pour permettre le relargage dans la circulation du lymphocyte T.

II - 3.2. La nécessité du 2ème signal

Le simple engagement du complexe CD3-TCR avec le CMH de la CPA présentant le peptide antigénique, stabilisé par la molécule co-réceptrice CD4 ou CD8, n'est pas suffisant pour pleinement activer un lymphocyte T naïf. Il faut impérativement qu'un **2ème signal** soit simultanément transmis au lymphocyte T par la CPA. Il repose aussi sur la liaison de deux molécules exprimées à la surface des cellules partenaires : la molécule **B7** exprimée sur la **CPA** et la molécule **CD28** retrouvée sur le **lymphocyte T**. Toutes les deux appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

La molécule **B7** est un homodimère transmembranaire dont la chaîne glycoprotéique est constituée de deux domaines d'homologie avec les immunoglobulines (un domaine d'homologie avec la région variable et un avec la région constante). On lui décrit deux isotypes, B7-1 et B7-2 (CD80 et CD86 respectivement).

La molécule **CD28** est un homodimère dont les chaînes, qui ne possèdent qu'un seul domaine d'homologie avec les régions variables des immunoglobulines, sont stabilisées par un pont disulfure inter-caténaire.

L'intervention de ces molécules dans l'activation du lymphocyte est démontrée in vitro par l'utilisation d'anticorps monoclonaux : les anti-B7 bloquent l'activation en empêchant la liaison lymphocyte T-CPA alors que les anti-CD28 activent les lymphocytes en reproduisant l'action de la molécule B7.

Le CD28 est le seul ligand des molécules B7 sur le lymphocyte T naïf. Après activation apparaît une deuxième molécule, appelée **CTLA-4** ("CTL antigen-4"), dont la séquence est très proche de celle du CD28, capable de lier aussi les molécules B7, avec une plus grande avidité que le CD28. A la différence de ce dernier, le CTLA-4 délivrerait un signal négatif au lymphocyte T effecteur (CTL dans ce cas), ce qui aurait pour conséquence de limiter la réponse immunitaire.

II - 3.3. Les macrophages

Nous renvoyons au cours *cellules de l'immunité*, (*chapitre VI*), nous contentant de rappels principaux.

Les macrophages sont des cellules qui font partie des premières lignes de défense de l'immunité naturelle, non spécifique. Dans ce cadre leur principale fonction, comme l'avait déjà démontré Elie METCHNIKOFF, est la ***phagocytose****.*

Les macrophages se trouvent dans toutes les zones du ganglion lymphoïde et phagocytent des microbes ou des antigènes particulaires. Comme la plupart des antigènes sont particulaires, les macrophages stimulent les réponses immunitaires contre un grand nombre d'infections.

Le macrophage au repos est une cellule qui exprime peu de molécules HLA de classe II et peu de molécules B7. L'ingestion de protéine soluble seule n'est pas capable d'augmenter suffisamment l'expression de co-signal B7 au-dessus du seuil de densité induisant l'activation du lymphocyte T. Dans ce contexte le macrophage n'accomplit que sa fonction d'éboueur vis-à-vis des débris cellulaires générés par les cellules de l'organisme en voie de sénescence sans, heureusement, activer les lymphocytes.

La situation est toute différente dans un contexte infectieux. Le macrophage est capable d'identifier un pathogène comme danger potentiel grâce à ses PRRs (pathogen recognition receptors). Le même récepteur qui permet la fixation du microorganisme au macrophage et sa phagocytose entraîne aussi l'activation du macrophage et l'augmentation notamment de l'expression de la molécule B7 au-dessus du seuil d'activation du lymphocyte T. Le macrophage fonctionne donc comme une CPA efficace uniquement dans un contexte **infectieux**.

*Ceci explique le rôle d'****adjuvant*** *des bactéries. De nombreuses protéines étrangères, injectées seules à l'animal, n'induisent pas de réponse immunitaire, parce qu'elles sont incapables de délivrer un deuxième signal co-stimulateur sur les lymphocytes T. Mélangées à des bactéries inactivées, encore capables cependant d'induire l'activité costimulante des CPA, elles deviennent immunogènes.*

II - 3.4. Les cellules dendritiques

Nous renvoyons au cours *cellules de l'immunité*, (*chapitre V*), nous contentant de rappels principaux.

Les cellules dendritiques dérivent de précurseurs hématopoïétiques et expriment de manière **constitutive** les antigènes HLA de classe I et de classe II, la molécule co-signal B7 et les molécules d'adhérence ICAM-1, ICAM-3 et LFA-3 lorsqu'elles sont localisées dans les glanglions. Ce sont les mêmes cellules, encore appelées **cellules réticulées interdigitées**, d'origine hématopoïétique, qui assurent, avec les macrophages, la sélection négative dans le thymus.

Les DC sont les cellules présentatrices d'antigène **(CPA) "professionnelles",** qui font le pont entre les composantes innée et adaptative de la réponse immunitaire.

Elles **seules** sont capables de **stimuler un lymphocyte T naïf**, car ce sont les seules CPA à exprimer, de manière constitutive, une forte densité de molécules de classe II du CMH et de molécules de costimulation.

Il existe plusieurs sous-populations de DC, que l'on retrouve sous deux états différents, **immatures,** quand elles capturent l'antigène**,** et **matures,** quand elles le présentent au lymphocyte T.

Il est important de ne pas confondre deux populations de cellules présentatrices d'antigène dont la dénomination peut prêter à confusion: les **cellules folliculaires dendritiques**, qui ont été étudiées dans le cours sur le lymphocyte B, et les **cellules dendritiques**, que nous venons de décrire. Les premières sont des CPA pour les lymphocytes B, présentes dans le ganglion, équipées pour présenter un antigène sous sa forme native. Elles sont pourvues de récepteurs en conséquence : Fc1R, CR1, CR3, CD23. Les deuxièmes sont des CPA pour les lymphocytes T, donc équipées pour présenter un antigène après apprêtement et activer le lymphocyte T.

II - 3.5. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B, outre leur rôle essentiel dans l'immunité humorale (*cours cellules de l'immunité, chapitre II-4*), sont aussi d'excellentes **CPA** pour les **antigènes solubles**, principalement les protéines, qui sont fixés par leurs immunoglobulines de surface.

Ce type d'antigène n'est pas correctement pris en charge ni par les macrophages, ni par les cellules dendritiques. Les immunoglobulines de surface focalisent l'antigène et font du lymphocyte B une CPA particulièrement efficace au cours d'une réponse immunitaire. Après liaison à l'immunoglobuline de surface l'antigène est internalisé, partiellement dégradé et réexprimé à la surface du lymphocyte B en association avec les antigènes HLA de classe II.

L'expression de la molécule co-signal B7 n'est pas constitutive sur le lymphocyte B : elle est **inductible**, notamment au cours des infections après stimulation du lymphocyte B par des produits bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharides).

Ceci explique que les lymphocytes B auto-réactifs, capables de lier des antigènes du soi soluble ne déclenchent pas normalement de réponse auto-immune puisqu'ils n'expriment pas spontanément la molécule B7. Nous verrons même plus loin qu'ils participent à l'établissement de la tolérance périphérique.

II- 4 Synthèse de l'interleukine-2 (IL-2) et de son récepteur

Les lymphocytes T matures naïfs sont des cellules quiescentes, dans le stade G0 du cycle cellulaire. L'activation par l'antigène les fait rentrer dans le stade G1 du cycle cellulaire. Elle se traduit par une synthèse d'interleukine-2 (**IL-2**), cytokine initialement décrite sous le nom de facteur de croissance de lymphocytes T ou **TCGF** (pour "T cell growth factor"), accompagnée par celle de son récepteur spécifique (**IL-2-R**). L'IL-2 entraîne une progression des lymphocytes T dans le cycle cellulaire qui se traduit, pendant quelques jours, par la survenue de 2 à 3 mitoses par jour, ce qui permet à une seule cellule de donner naissance à des centaines de descendants qui portent tous le même TCR.

L'IL-2, uniquement produite par les lymphocytes T, est une glycoprotéine de 153 acides aminés et d'environ 15 à 20 kD dont le gène est localisé sur le chromosome 4 q 26-q 27 (voir cours *cytokines, chapitre IV-2-1-3*).

Son récepteur est constitué de 3 chaînes polypeptidiques : 9 9 et 1. La chaîne 9 est aussi appelée Tac ou p55 ou **CD 25**, la chaîne 9 p75 ou **CD 122**. La chaîne 1 ou sous-unité p64 ne lie pas l'IL-2 et est commune aux récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-9 : elle est appelée chaîne 1 commune.

Une mutation de cette chaîne 1 *est responsable d'un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (**x-scid** pour "x-linked cellular immunodeficiency"). L'hétérodimère* 9/1 *forme un IL-2-R de faible affinité pour l'IL-2 et est retrouvé sur les lymphocytes T quiescents. Les lymphocytes T activés portent un IL-2-R complet, trimère* 9/9/1*, à forte affinité pour l'IL-2, capable alors de répondre à de plus faibles concentrations d'IL-2. La transduction du signal consécutif à la liaison de l'IL-2 à son récepteur fait intervenir la tyrosine kinase p56 ^{lck}.*

La liaison de l'antigène au complexe TCR-CD3 aboutit, en ultime action, à l'apparition de **facteurs de transcription**. L'un d'entre eux, le **NF-AT**, ou "nuclear factor of activation of T cells" se lie au promoteur du gène de l'IL-2, et est donc capable d'induire la transcription du gène de la cytokine. Cette transcription est amplifiée par un facteur de 2 à 3 suite à la liaison de la molécule B7 au récepteur CD28. Le deuxième effet de la liaison B7-CD28 est la **stabilisation de l'ARN messager** de la cytokine. On voit donc qu'en l'absence de ce 2ème signal il n'y a pas, ou peu, d'IL-2 produite. Ces deux effets conjugués accroissent la production d'IL-2 par un facteur 100.

La régulation de l'expression du récepteur de l'IL-2 est différente de celle de la cytokine ligand. Elle n'est pas aussi dépendante du 2ème signal. La simple liaison du peptide antigénique au complexe TCR-CD3 suffit : un lymphocyte T ainsi activé par une cellule présentant l'antigène sans co-signal (B7) peut donc répondre de manière paracrine à de l'IL-2 exogène.

II-5 La tolérance périphérique

En l'absence de 2ème signal la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte T conduit à l'anergie de ce dernier secondaire à l'absence de production d'IL-2. L'**anergie** est le résultat d'un phénomène actif qui aboutit à un état de non-réponse spécifique lors de toute rencontre ultérieure avec l'antigène en cause, même présenté par une CPA professionnelle avec un co-signal adéquat. Le lymphocyte T n'est plus alors capable d'être activé, de proliférer et de donner naissance à des cellules effectrices et mémoire.

Ce phénomène explique la **tolérance périphérique** vis-à-vis des antigènes du soi tissu-spécifiques, donc non présents dans le thymus. Les lymphocytes T spécifiques de ces antigènes du soi échappent donc à la sélection négative thymique. On comprend dès lors que la stimulation de ces lymphocytes T auto-réactifs par des lymphocytes B auto-réactifs exprimant des peptides auto-antigéniques solubles en absence de B7 aboutit à un état de tolérance.

II - 6. L'activation des lymphocytes T effecteurs

Le lymphocyte T effecteur, contrairement au lymphocyte T mature naïf lors de sa sensibilisation initiale par l'antigène, n'a **pas besoin d'un deuxième signal** pour être activé lors de sa rencontre ultérieure avec le même antigène.

Ceci est important car les cellules-cibles des lymphocytes T effecteurs n'expriment pas ou peu la molécule B7: la plupart des cellules de l'organisme, qui peuvent être infectées par un virus et donc être la cible des CTL CD8^{+}, n'expriment pas la molécule B7. Quant aux macrophages et aux lymphocytes B, respectivement cibles des lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2, nous avons vu que leur niveau d'expression constitutive de la molécule B7 était faible.

L'activation du lymphocyte T effecteur entraîne des modifications phénotypiques qui traduisent des modifications fonctionnelles: la plus importante est l'augmentation des capacités d'adhérence consécutive à l'**augmentation** de l'expression des molécules **LFA-1** et **CD2.**

*Cette augmentation vise à pallier la plus faible expression des adressines ICAM-1 et LFA-3 par la plupart des cellules de l'organisme comparativement aux CPA. De même la substitution de la sélectine CD62-L par une 9$_1$-intégrine, connue sous le nom de **VLA-4** (pour "very late antigen 4"), focalise la recirculation des lymphocytes effecteurs au site inflammatoire. Cette intégrine est un hétérodimère constitué d'une chaîne 9$_1$ commune à toutes les intégrines de cette famille, et reconnue par les anticorps du cluster CD29, et d'une chaîne 9 spécifique reconnue par les anticorps du cluster CD49d. Ses ligands sont la **fibronectine** et une adressine connue sous le nom de **VCAM-1** (pour "vascular cell adhesion molecule 1"), appartenant à la superfamille des immunoglobulines et retrouvée notamment à la surface des cellules endothéliales activées.*

*Enfin la molécule **CD45**, tyrosine phosphatase intervenant dans l'activation des lymphocytes T possèdent plusieurs iso-formes: les lymphocytes **T naïfs** quiescents expriment l'iso-forme **CD45RA** alors que les lymphocytes **T effecteurs** portent l'iso-forme **CD45RO** qui a pour effet de diminuer le seuil de sensibilité du TCR à son ligand peptide-CMH.*

La différenciation des lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ en lymphocytes Th1 et T h2 est l'évènement-clé qui décide de la nature cellulaire ou humorale de la réponse immunitaire. Elle se fait après passage par un stade intermédiaire **Th0**. Le choix entre **Th1** et **Th2** se caractérisent par une production différente de cytokines, est à ce jour imparfaitement connu (cours *cytokines, chapitreIV-2-1-2)*.

L'induction des **CTL $CD8^+$** peut se faire de différentes manières: soit directement si la cellule infectée est une CPA professionnelle exprimant suffisamment de molécule co-signal B7, soit indirectement avec l'aide des lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ dont les fonctions sont d'induire ou d'augmenter l'expression de la molécule B7 sur la cellule infectée et de sécréter de l'IL-2 auquel le lymphocyte CTL $CD8^+$ pourra répondre puisque la seule liaison antigène-TCR suffit à déclencher l'expression de l'IL-2-R.

III. PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS.

Les fonctions des lymphocytes effecteurs sont la conséquence des interactions cellulaires qu'ils établissent avec leurs cellules-cible. Le principal focalisateur en est le TCR, dont la présence est commune pour tous les lymphocytes T, alors que les mécanismes effecteurs, dont les effets varient avec la nature des sous-populations de lymphocytes T, dépendent de protéines de membrane et de protéines sécrétées.

Afin qu'ils puissent augmenter leur probabilité de rencontre avec leur antigène spécifique, nous avons vu que les lymphocytes T effecteurs subissent des modifications phénotypiques: apparition de nouvelles intégrines, telles que VLA-4, qui les focalisent dans les foyers inflammatoires où ils ont le plus de chances de rencontrer l'antigène exogène dont ils sont spécifiques. L'augmentation, comparativement aux lymphocytes T naïfs, quiescents, de l'expression des intégrines LFA-1 et CD2, favorise le ralentissement non spécifique du lymphocyte T dans le foyer inflammatoire, ce qui lui permet d'y tester les différentes combinaisons peptide-CMH présentes à la surface des cellules. Si aucune n'est capable d'être reconnue par le TCR du lymphocyte T, celui-ci est relargué. Dans le cas contraire l'augmentation de l'affinité de la liaison LFA-1-ICAM-1 permet un contact plus durable entre le lymphocyte T et sa cible nécessaire pour que les effets du premier sur la seconde puissent apparaître. La durée requise minimum de temps de contact est plus courte pour les CTL $CD8^+$ que pour les lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$.

Dans le cas d'une liaison fermement établie entre un lymphocyte T effecteur et sa cible, via l'interaction TCR-peptide-CMH, le cytosquelette du lymphocyte T se réorganise et se polarise au point de contact : ceci permet un **relargage focalisé** des molécules effectrices qui, elles, ne sont pas spécifiques de l'antigène. Elles ne doivent donc agir que sur la cible appropriée, et la focalisation de leur excrétion est le mécanisme qui permet au lymphocyte T de conserver la spécificité de l'action que lui confère le TCR.

Les fonctions effectrices du lymphocyte T sont supportées par des **protéines de membrane** et des **protéines sécrétées**.

III-1- PROTEINES DE MEMBRANE

L'existence de protéines de membrane nécessaires à l'apparition des propriétés effectrices des lymphocytes T explique pourquoi, in vitro, le seul apport de surnageant de culture de lymphocytes T ne soit pas suffisant pour qu'apparaissent le plus souvent les effets des lymphocytes T sur leurs cellules-cible.

Les glycoprotéines de membrane impliquées appartiennent :

- à la famille du **TNF**9 (pour "tumor necrosis factor 9" ou facteur de nécrose des tumeurs 9). Il s'agit des molécules **CD40L** (pour ligand du CD40) sur le lymphocyte **T CD4$^+$Th2**, et **FasL** (pour ligand de Fas) sur les **CTL** CD8$^+$.

- et leurs ligands, sur la cellule-cible, à celle des **récepteurs du TNF**9. Pour les membres de la famille des récepteur du TNF il s'agit de la molécule **CD40**, retrouvée sur les **lymphocytes B**, cibles des lymphocytes Th2, et de la molécule **Fas** exprimée par les **cibles des CTL** *(*voir cours *cytokines, chapitre III-1-1-3)*.

III-2- PROTEINES SECRETES

Les protéines sécrétées sont soit des cytotoxines, soit des cytokines.

III-2-1 cytotoxines

Les **cytotoxines** équipent les CTL, sont **non spécifiques d'antigène** et sont capables d'agir directement sur toutes les cellules. Elles sont décrites ultérieurement (IV-3-3).

III-2-2 cytokines

Les **cytokines**, quant à elles, équipent les lymphocytes **T auxiliaires CD4$^+$**, et leurs effets sur leurs cellules-cible est la conséquence de leur liaison à des récepteurs spécifiques. Elles ont été étudiées dans un cours spécifique, auquel nous renvoyons.

Nous ne rappelerons que le paradigme TH1/TH2.

La différence entre les sous-populations de lymphocytes T CD4 auxiliaires TH1 et TH2 repose sur la nature des cytokines sécrétées. Certaines sont communes aux deux types de lymphocytes, comme l'IL-3 et le GM-CSF. Les lymphocytes **TH1** sont caractérisés par la sécrétion d'**IL-2** et d'**IFN**1 alors que les lymphocytes **TH2** le sont par la sécrétion d'**IL-4**, **IL-5**, **IL-6** et **IL-10**.

IV. LA CYTOTOXICITÉ T.

IV. 1. LES LYMPHOCYTES T CYTOTOXIQUES

La cytotoxicité cellulaire se définit par l'action toxique (ou lytique) de cellules, appelées effectrices, vis-à-vis d'autres cellules, dites cibles, aboutissant à la mort de ces dernières.

L'action cytotoxique des lymphocytes T est dirigée contre des antigènes **intra-cellulaires**, inaccessibles par construction aux effets des anticorps, produits de la réponse immunitaire humorale. Il s'agit de bactéries à développement intra-cellulaire, telles que les mycobactéries ou le germe responsable de la listériose, ou de virus dont le mode de réplication en fait des micro-organismes à développement intra-cellulaire obligatoire.

Vis-à-vis de tels agresseurs, la défense de l'organisme repose sur les lymphocytes T cytolytiques **CTL CD8$^+$**.

La fréquence des infections à germe de localisation intra-cellulaire chez les sujets déficitaires en molécules HLA de classe I, qui restreignent la réponse aux lymphocytes T CD8$^+$, est un argument fort en faveur

de l'implication de ces derniers dans la réponse cytotoxique. Cette dernière doit être bien ciblée car la lyse de la cellule infectée est le prix à payer pour l'éradication de l'infection.

Les CTL se retrouvent dans les deux populations de lymphocytes T : ceux, majoritaires, à TCR 99 et ceux, minoritaires à TCR 11.

IV-1-1- Les CTL à TCR99

Pour les premiers c'est principalement dans la population des lymphocytes T TCR 99 $CD8^+$ qui se recrutent les CTL.

La molécule CD8 y est sous forme d'hétérodimère 99. Les molécules de costimulation CD28 (ligand des protéines B7 ou CD80 et CD86) et CD11b/CD18 (ligand de ICAM) y sont d'expression mutuellement exclusive.

Il existe quelques lymphocytes T TCR 99 $CD4^+$ doués de propriétés cytolytiques. Ce sont principalement des CD4 Th0 ou Th1. Ils exercent leur pouvoir cytolytique principalement par le biais du ligand de Fas (Fas-L) qu'ils expriment à leur membrane.

De par leur liaison respective aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de classe II, les CTL $CD8^+$ et $CD4^+$ sont responsables d'une cytotoxicité qui est restreinte par le CMH. La cellule cible et la cellule effectrice doivent impérativement partager les mêmes antigènes d'histocompatibilité.

IV-1-2- Les CTL à TCR 11.

Les lymphocytes T à TCR 11 et à activité CTL peuvent être indifféremment $CD4^+$, $CD8^+$ (et dans ce cas homodimère 99) ou $CD4^-$ $CD8^-$. La reconnaissance de leurs cellules cibles peut être restreinte soit par les antigènes HLA de classe I non-classique, soit par les molécules CD1.

Ces molécules CD1 (CD1 a, b, c, d ou e) sont des glycoprotéines apparentées aux molécules du CMH (sans être codées dans le CMH puisque leurs gènes sont localisés en 1q22-23) et associées à la 92 microglobuline. Pour les lymphocytes T à TCR 11 la nature de l'antigène présenté par les molécules CD1 est inconnue, alors qu'il s'agit de lipides et de lipoglycannes (acides mycoliques) pour les lymphocytes T à TCR 99 (voir cours "Récepteur du lymphocyte T V").

Enfin certains lymphocytes T 11 semblent pouvoir reconnaître l'antigène sous sa forme native, comme l'anticorps, sans restriction par une molécule présentatrice. Ceci semble le cas particulièrement pour des phosphoantigènes.

Les mécanismes de cytotoxicité par le CTL font intervenir des contacts cellulaires spécifiques et des phénomènes d'exocytose du contenu des granulations des CTL.

IV-2- CTL ET MOLÉCULES D'ADHÉRENCE

La reconnaissance spécifique se fait par l'intermédiaire du TCR qui va transmettre le signal d'activation via les chaînes du CD3. Le couplage de molécules d'adhérence à l'interface cellule effectrice-cellule cible va fournir les signaux nécessaires à l'activation optimale de la cellule effectrice. On peut citer :

sur l'effecteur	sur la cible
LFA-1 (CD11a/CD18)	ICAM 1,2,3
CR3 (CD11b/CD18)	ICAM 1
CD2	LFA-3 (CD58)
CD4	CMH de classe II
CD8	CMH de classe I
CD28 et CTLA4	Protéines B7 (CD80 et CD86)
VLA4 (CD49d/CD29)	VCAM-1

Après établissement du contact CTL-cellule cible il y a délivrance du "coup fatal" ("lethal hit") par le premier à la seconde. Ce processus, d'abord réversible, devient rapidement irréversible.

IV-3 CTL et lyse cellulaire

La lyse de la cellule cible peut se faire selon deux processus : la nécrose ou l'apoptose.

IV - 3-.1. La nécrose cellulaire

C'est le phénomène de mort cellulaire le mieux connu, décrit depuis longtemps. L'agent causal de la mort cellulaire est **extérieur** à celle-ci (diminution des apports d'oxygène, lyse membranaire par activation du complément par exemple). Il est la conséquence de phénomènes ischémiques, toxiques et physiques. La nécrose cellulaire s'accompagne d'une rupture de la membrane cytoplasmique et d'une libération importante de toxines cellulaires, responsables de phénomènes inflammatoires, ou de particules infectieuses virulentes (virions) en cas d'infection. Elle peut donc être néfaste pour l'organisme.

IV - 3-.2. L'apoptose

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire physiologique, n'induisant pas d'effets néfastes. Elle intervient au cours de l'embryogénèse et de la sélection thymique (sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs).

Contrairement à la nécrose ou l'agent de la mort cellulaire est extérieur à la cellule, l'apoptose est déclenchée par un stimulus interne. Elle est caractérisée par la fragmentation de l'ADN en tronçon de 200 paires de bases correspondant à l'intervalle entre les nucléosomes, et par la condensation du cytoplasme avec rétraction cellulaire et aspect de bullage. Au terme du processus la cellule est fragmentée en "corps apoptotiques" entourés d'une membrane intacte qui sont rapidement phagocytés et éliminés, ce qui explique l'absence de phénomènes inflammatoires. Les endonucléases sont aussi capables d'agir sur l'ADN viral dans le cytosol de la cellule infectée, conduisant ainsi à l'inactivation du virus.

L'apoptose provoque donc une **mort cellulaire sans dissémination de l'infection.**

Suite à un signal membranaire médié entre autre par la molécule Fas (ou Apo-1 ou CD95) une cascade de protéases (identique au système du complément ou de la coagulation) est activée. Ce sont des protéases à cystéine (ayant un résidu cystéine dans leur site actif) qui possèdent toutes une activité protéasique vis-à-vis de substrat dont l'acide aminé P1 est un acide aspartique (par convention une protéase clive un substrat entre les acides aminés P1 et P1'). On les appelle donc **caspase** (pour "**C**ystéine-protéase à activité **Asp-Ase**).

On en a décrit 10 à ce jour. Elles préexistent sous forme de pro-enzymes qui sont clivés par la caspase d'amont. La hiérarchie d'activation des caspases n'est pas totalement élucidée. Certaines sont amplificatrices ou régulatrices et interviennent en premières (caspases 1,4 et 5).

*Elles sont soumises à l'action inhibitrice des protéines de la famille **bcl-2**. Ces protéines sont des protéines transmembranaires, principalement ancrées dans la membrane externe mitochondriale possédant toutes une région analogue commune de 66 acides aminés environ, qui comporte deux domaines d'homologie de type bcl-2 (domaines BH1 et BH2). Le mode d'action des protéines de la famille bcl-2 n'est pas connu : en fonction de leur degré de phosphorylation (sur une serine) elles peuvent avoir une activité anti- ou pro-apoptotique.*

*L'activation des autres caspases, dites d'exécution (3, 6, 7 et 9) constitue un point de non-retour pour la cellule avec un engagement irréversible vers la mort. Leurs différents substrats sont soit cytoplasmiques (protéine kinase C*1*, régulateur de l'activité des protéines G, actine, etc...) soit nucléaires (U1-ribonucléoprotéines, lamine nucléaire, poly (ADP-ribose) polymérase etc...).*

Par des mécanismes non encore parfaitement connus la cascade des caspases aboutit à la fragmentation de l'ADN par des endonucléases et à la perte d'asymétrie des phospholipides membranaires avec apparition de phosphatidyl-serine dans le feuillet externe.

IV - 3-.3. Cytotoxicité granulaire

Lors du contact CTL-cellule cible, le lymphocyte T place son noyau à l'opposé de la cellule-cible et réoriente son cytosquelette, avec son appareil de Golgi et son centrosome (centre organisateur des microtubules et du cytosquelette) vers le point de contact. Il s'en suit une exocytose des lysosomes (granulations) polarisée, calcium-dépendante.

Les CTL contiennent dans leurs granules des cytotoxines **préformées**, ce qui explique la brièveté de leur délai d'action, de l'ordre de 5 minutes après le contact CTL-cellule-cible. On décrit deux types: la **perforine** et les **granzymes.**

L'arsenal cytotoxique contenu dans les lysosomes est composé de médiateurs qui pour certains (perforine) sont responsables de nécroses et pour d'autres (granzymes) responsables d'apoptose.

IV - 3-.3-.1. La perforine

C'est une protéine de 70 kD qui possède des homologies de séquence avec le composant C9 du complément. En présence de calcium la perforine se polymérise (12 à 18 molécules) et donne naissance à une structure tubulaire transmembranaire, capable, tout comme le poly C9, d'entraîner une lyse osmotique de la cellule par fuite massive d'eau et d'électrolytes. Le canal peut aussi servir à l'entrée d'autres composants cytotoxiques dans la cellule-cible.

IV- 3-.3-.2. Les granzymes (= en***zymes*** de ***gran***ules)

Ce sont des enzymes qui appartiennent à la famille des **protéases à sérine** (un résidu sérine dans le site catalytique). Elles se différencient par la nature de l'acide aimé P1 du site de clivage de leur substrat :

- sérine-protéase de type tryptase ou Arg-ase (P1 : arginine) : granzyme A, granzyme C
- sérine-protéase de type Asp-ase (P1 : acide aspartique) : granzyme B
- sérine-protéase de type Met-ase (P1 = méthionine)

Pour la cytotoxicité cellulaire c'est la **granzyme B** qui semble avoir le plus d'importance puisque par son activité de type Asp-ase elle est capable de cliver certaines des caspases d'exécution, et donc d'enclencher la machinerie apoptotique de façon irréversible, en aval des processus de régulation par les protéines de la famille bcl-2.

Bien que leurs effecteurs ne soient pas spécifiques de l'antigène, les CTL tuent spécifiquement leur cellule-cible, sans s'attaquer aux cellules non infectées du voisinage. Ceci est du, entre autres, au relargage des cytotoxines focalisé au point de contact CTL-cellule-cible. Les cellules non infectées du voisinage sont ainsi épargnées, ce qui est fondamental, notamment pour les tissus à faible capacité de régénération, comme les neurones.

IV-3-4 Cytotoxicité membranaire

Contrairement à la cytotoxicité granulaire, la cytotoxicité membranaire est indépendante du calcium. Elle est médiée par un membre de la superfamille du TNF-9, le ligand de Fas ou **Fas-L** qui reconnaît, sur la cellule cible, la molécule **Fas** (ou Apo-1 ou **CD95**) sous forme trimère. La liaison Fas-L-Fas induit l'apoptose par l'activation de la cascade des caspases. Cette voie est principalement utilisée par des CTL $CD4^+$, mais aussi à un moindre degré, par les CTL $CD8^+$, les T à TCR 11 et les cellules NK.

IV -3-5 Cytokines et cytotoxicité.

Les CTL produisent aussi de l'**IFN**1 et du **TNF**9 qui interviennent dans les mécanismes de cytotoxicité. L'IFN1 a un effet direct inhibiteur sur la réplication virale. Il est aussi capable d'augmenter l'expression des antigènes HLA de classe I et des transporteurs de peptides TAP-1 et TAP-2, ce qui concourt à une plus grande capacité de présentation des peptides viraux par la cellule infectée. De même il active les macrophages, et son action sur cette dernière cellule se fait en synergie avec le TNF9.

V LES LYMPHOCYTES T $CD4^+$ Th1

Un certain nombre de bactéries à développement intra-cellulaire, telles que les mycobactéries responsables de la tuberculose et de la lèpre, sont capables de survivre dans les phagosomes des macrophages qui les ont ingérées, car elles inhibent la fusion de ces vésicules de phagocytose avec les lysosomes contenant les enzymes protéolytiques. Elles sont donc capables ainsi d'échapper aux CTL. Il est donc nécessaire que les macrophages soient activés pour tuer ces germes. Ce rôle d'**activation** est dévolu aux lymphocytes T auxiliaires **$CD4^+$Th1**.

V - 1 Activation des macrophages

Les lymphocytes T $CD4^+$Th1 sont capables d'activer les macrophages après liaison au complexe peptide-CMH de classe II portés par ces derniers. Les peptides proviennent soit de bactéries à développement intra-cellulaire de type mycobactérie, soit de germes extra-cellulaires phagocytés tels que le *Pneumocystis carinii*, voire de parasites de type helminthes tels que les Schistosomes.

Deux signaux sont nécessaires pour que le macrophage soit activé:

- l'**IFN**1 délivré par le lymphocyte T $CD4^+$Th1 constitue le premier signal.
- un **co-signal** est nécessaire et peut être apporté soit par la liaison de **TNF membranaire** à la surface du lymphocyte T avec un récepteur porté par le macrophage, soit par des **LPS** bactériens. Cette dualité du message d'activation est un mécanisme de protection qui maintient le plus souvent le macrophage à l'état quiescent, afin de ne pas altérer le soi.

V -2 Délai d'action des lymphocytes T $CD4^+$Th1

A la différence des CTL dont le délai d'action est court, en raison de la disponibilité immédiate des cytotoxines, les lymphocytes T $CD4^+$Th1 ont un délai d'action de plusieurs heures qui s'explique par la **synthèse des cytokines** impliquées. Il faut donc que le temps de contact entre le lymphocyte et le macrophage, qui est fonction de la liaison TCR-peptide-CMH de classe II stabilisée par la molécule CD4 et par les différentes molécules d'adhérence, soit suffisamment long. L'activation du TCR se traduit *in fine* par l'apparition de facteurs de transcription des gènes de cytokines. Comme pour les CTL la réorganisation du cytosquelette, consécutive à l'activation du lymphocyte, focalise l'excrétion des cytokines au point de contact des cellules, ce qui protège les macrophages non infectés du voisinage, dont l'activation serait préjudiciable. Un deuxième mécanisme protecteur existe: en 3' de l'ARN messager des cytokines existe une séquence qui déstabilise l'ARN: son activité est bloquée suite à la stimulation de la molécule CD28 après contact avec la molécule B7 du macrophage. Dès que le contact cellulaire est interrompu, l'**activité stabilisatrice du CD28** sur l'ARN messager des cytokines cesse, ce qui aboutit à un arrêt de la traduction.

V -3 Les macrophages activés

Le macrophage à l'état basal est une cellule quiescente, ce qui prévient les risques d'agression inappropriée du voisinage. Son activation par les lymphocytes T $CD4^+$Th1 entraîne une augmentation de l'activité lytique vis-à-vis des germes intra-cellulaires par l'intermédiaire des radicaux libres d'oxygène, du monoxyde d'azote et des enzymes lysosomiales. De plus l'activation augmente ses capacités de CPA en augmentant l'expression des antigènes HLA de classe II et du TNF-R.

V -4 Les cytokines des lymphocytes T $CD4^+$Th1

Parmi les cytokines sécrétées par les lymphocytes T $CD4^+$Th1, l'**IFN**1 est celle qui remplit un rôle crucial dans l'activation des macrophages.

*Ceci est bien démontré chez les souris génétiquement invalidées ("knock-out") pour le gène de l'IFN*1*, qui décèdent après des injections à doses normalement sublétales de mycobactéries ou de Leishmania pour leur congénères normales.*

*Les autres cytokines ont un rôle indirect: l'**IL-2**, par la prolifération des lymphocytes T qu'elle entraîne, augmente le nombre de cellules effectrices. L'**IL-3**, le **GM-CSF**, par leur activité hématopoïétique stimulante, augmente le nombre de macrophages. Enfin le **TNF**9, ou **lymphotoxine**, modifie les propriétés des cellules endothéliales de telle façon que la diapédèse est facilitée, et se révèle capable de lyser les cellules infectées.*

V -5 Le granulome inflammatoire

Le résultat final de l'activation des macrophages par les lymphocytes T $CD4^+$Th1 est la formation d'une entité anatomo-pathologique définie comme le **granulome inflammatoire.**

*Son but est de limiter la dissémination de l'infection. On retrouve en son centre de nombreux macrophages, avec des germes intra-cellulaires. La fusion de ces cellules aboutit à la formation de cellules géantes multi-nucléées. Des cellules épithélioïdes sont également présentes. Des lymphocytes T $CD4^+$Th1 sont retrouvés en périphérie, mais également des CTL et des lymphocytes T $CD4^+$Th2. La lyse des germes se fait par diminution des apports d'oxygène, cytotoxicité cellulaire et activation des macrophages. Dans le cas du germe responsable de la tuberculose elle se traduit par une **nécrose caséeuse.***

Ce type de réaction est le prototype des réactions d'**hypersensibilité de type IV**, encore appelée **hypersensibilité retardée**. Elle est explorée en clinique par les réactions d'introdermoréaction à la tuberculine.

*Dans la **classification de Gell et Coombs**, c'est le seul type qui fasse intervenir l'immunité cellulaire. Cette classification, proposée en 1967, repose sur les **délais d'apparition** des manifestations pathologiques et la nature des **médiateurs**. Le **type I**, ou hypersensibilité **immédiate** ou **anaphylaxie**, est d'apparition immédiate au contact avec l'antigène qui est dans ce cas appelé **allergène**. Son médiateur est l'**IgE** capable de faire dégranuler les polynucléaires basophiles et les mastocytes. Le **type II** ou **cytotoxique**, de délai d'apparition rapide, est le fruit de l'action des anticorps cytotoxiques capables d'entraîner la lyse des cellules soit par activation du complément, soit par sensibilisation de cellules tueuses ("killer") porteuses de récepteur pour le Fc des IgG. Enfin le **type III** ou hypersensibilité par **complexes immuns**, d'apparition semi-retardée, résulte de l'activation du complément par des complexes antigène-anticorps déposés dans les tissus.*

RESUME

L'activation des lymphocytes T spécifiques de l'antigène nécessite des cellules présentatrices d'antigènes d'antigène professionnelles (CPA). A leur sortie du thymus, les lymphocytes matures naïfs circulent à travers le réseau des organes lymphoïdes secondaires, dans le parenchyme desquelles ils sont capables de pénétrer par le processus de diapédèse, grâce à des interactions cellulaires avec les cellules endothéliales cubiques des veinules post-capillaires. Ces contacts reposent sur la reconnaissance de molécules d'adhérence, exprimées à la surface des cellules et appartenant à différents familles: sélectines, intégrines et adressines de la superfamille des immunoglobulines. La caractéristique principale des CPA est d'exprimer des molécules co-stimulantes, dont les mieux caractérisées sont les molécules B7-1 et B7-2. Leurs ligands sur le lymphocyte T naïf la molécule CD28, et sur le lymphocyte T activé la molécule CTLA-4. Il existe trois types de CPA : les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Les macrophages, aux fonctions principalement phagocytaires à l'état basal, expriment de fortes quantités de molécules de classe II du CMH et de molécules B7 après ingestion d'agents infectieux. La capacité particulière du lymphocyte B de lier des antigènes protéiques soluble par son BCR et de les internaliser peut être importante pour stimuler les lymphocytes T, pour autant que ces antigènes soient aussi capables d'induire l'expression de la molécule B7 à la surface du lymphocyte B. Les cellules dendritiques sont les seules CPA à exprimer de manière constitutive de fortes concentration membranaire de molécules B7 et d'antigènes de classe II du CMH. Elles sont donc particulièrement adaptées à la présentation de pathogènes, tels que les virus, qui n'induisent pas d'activité co-stimulante dans les macrophages. Le contact entre le lymphocyte T et la CPA entraîne l'activation du premier qui se traduit par une prolifération clonale et une différenciation en lymphocyte T effecteur dont on distingue trois populations: les lymphocytes T cytolytiques (CTL), principalement CD8+, dont la fonction est de lyser les cellules infectées après reconnaissance de l'antigène présenté par les molécule de classe I du CMH; les lymphocytes T helper Th1 dont le rôle est d'activer les macrophages et les lymphocytes helper Th2 dont la fonction est d'aider les lymphocytes B. La prolifération et la différenciation des lymphocytes T dépend de la production de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'expression de son récepteur (IL-2R) par le lymphocyte T. Les lymphocytes T dont le TCR est engagé en l'absence de de co-signal ne produisent pas d'IL-2, et deviennent anergiques. Ceci prévient la réponse des lymphocytes T auto-réactifs naïfs, ayant échappé à la sélection négative thymique, contre des cellules du soi qui n'expriment pas normalement de molécules de co-stimulation. Le lymphocyte T activé devenu lymphocyte T effecteur ou armé, adhère fortement à sa cellule cible, grâce à des molécules d'adhérence et libère ses molécules actives directement au contact de celle-ci, ce qui entraîne selon les cas l'activation ou la mort de la cible. La plupart des médiateurs sont des cytokines, et l'arsenal cytokinique varie selon la nature du lymphocyte T effecteur. Les lymphocyte T helper Th2 sécrètent des cytokines (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10) qui activent les lymphocytes B, tandis que les lymphocytes T helper Th1 sécrètent des cytokines (IL-2, IFN-1) qui activent les macrophages et que les CTL libèrent de l'IFN-1. Cette cytokine inhibe la réplication virale et induit l'expression des antigènes de classe II du CMH sur les macrophages qu'ils activent. Les CTL libèrent aussi des cytotoxines qui sont les principaux médiateurs de leur activité cytolytique. Ces médiateurs sont de deux types, granzymes et perforine. La dernière permet aussi la pénétration des granzymes qui sont responsables de l'apoptose de la cellule cible, après activation de la cascade des caspases, protéases à cystéine. L'apoptose est une mort cellulaire cellulaire sans réaction inflammatoire néfaste, qui peut aussi être induite après liaison de la molécule Fas (ou Apo1, ou CD95) exprimée sur la cellule cible, à son ligand (Fas-L) sur le CTL. Les lymphocytes T $CD4^+$ Th1 qui activent les macrophages jouent un rôle capital dans la défense de l'hôte contre des pathogènes intra-cellulaires qui se sont adaptés pour survivre

dans les macrophages non-activés. L'activation du macrophage nécessite deux signaux: l'IFN-1 apporté par le lymphocyte T $CD4^+$ Th1 et des signaux co-stimulateurs donnés par l'agent infectieux (LPS) ou le macrophage (TNF). Le résultat final est la formation d'un granulome inflammatoire.

POUR EN SAVOIR PLUS

JANEWAY CA, TRAVERS P. *Immunobiologie* De Boeck Université, Bruxelles, 1997: 267-307

REVILLARD JP. *Immunologie* De Boeck Université, Bruxelles, 1998

TESTEZ-VOUS

🗁 - Les lymphocytes T cytotoxiques:

A - expriment la molécule CD4
B - reconnaissent sur leur cible le peptide antigénique présenté par la molécule HLA de classe 1
C - provoque la nécrose de leur cellule cible
D - établissent le contact avec leur cellule cible grâce à l'interaction des molécules CD40L et CD40 exprimées respectivement sur le CTL et la cellule cible
E - contiennent dans leurs granules de la perforine et des granzymes

🗁 - Les cytokines :

A - sont des médiateurs solubles préformés
B - ont un poids moléculaire compris entre 100 et 150 kD
C - sous leur forme recombinante, pour certaines, sont déjà utilisées en thérapeutique
D - se fixent à un récepteur spécifique sur leur(s) cellule(s) cible
E - ont le plus souvent un pléïmorphisme d'activité

🗁 - Les propositions suivantes concernent le macrophage:

A - Ce sont les seules cellules présentatrices d'antigène
B - Ils expriment peu de molécules HLA de classe 2 et de molécules B7 à l'état basal (quiescent)
C - Ils possèdent des récepteurs pour les produits de dégradation du complément
D - Ils appartiennent aux systèmes de défense de l'immunité naturelle, non spécifique
E - Ils phagocytent plus efficacement les microbes opsonisés par les anticorps ou le complément

🗁 - La molécule CD3 est un marqueur de surface spécifique :

A - des lymphocytes T cytotoxiques exclusivement
B - des lymphocytes B
C - des lymphocytes T
D - des cellules tueuses naturelles ou NK ("natural killer cells")
E - des lymphocytes T auxiliaires exclusivement

🗁 - Les lymphocytes T auxiliaires ("helper"):

A - expriment la molécule CD4
B - reconnaissent sur leur cible le peptide antigénique présenté par la molécule HLA de classe 1
C - provoquent la nécrose de leur cellule cible
D - établissent le contact avec leur cellule cible grâce à l'interaction des molécules CD40L et CD40 exprimées respectivement sur le lymphocyte T et la cellule cible, quand celle-ci est un lymphocyte B
E - contiennent dans leurs granules de la perforine et des granzymes

❻ - Dans l'infiltrat cellulaire constaté dans une biopsie de la zone inflammatoire d'une intra-dermoréaction positive à la tuberculine, les cellules qui dominent sont :

A - les polynucléaires neutrophiles
B - les mastocytes
C - les lymphocytes B
D - lymphocytes T4
E - les macrophages

EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ

I - SEMEIOLOGIE CLINQUE

I-1- Interrogatoire

I-2- Examen clinique

I-2-1-L'examen ostéomédullaire
I-2-2-L'examen des ganglions
I-2-3-L'examen de la rate
I-2-4-L'examen du foie
I-2-5-Autres examens

II - EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ HUMORALE SPÉCIFIQUE

II -1- matériel d'étude

II -2 Les différentes sources d'anticorps.

II-2-1 Antisérums polyclonaux
II-2-2 Antisérums monoclonaux

II-3 Electrophorèse des protéines sanguines

II-4 Dosage des immunoglobulines

II-5 Dosage des anticorps spécifiques

II-6 Immunoelectrophorèse et immunofixation du sérum et des urines

II-7 Recherche d'auto-anticorps

II-8 Facteurs rhumatoides

III- EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE SPÉCIFIQUE

III-1 Matériel d'étude

III-2 Cytométrie en flux

III-3 Exploration du CMH

IV- EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ HUMORALE NATURELLE

IV-1 Exploration du complément

IV-1-1 Dosages pondéraux des composants du complément
IV-1-2 Activité fonctionnelle
IV-1-2-1 voie classique
IV-1-2-2 voie alterne
IV-1-2-3 intérêt diagnostique

IV – 2 méthodes d'exploration des cytokines

IV- 2 - 1 – Etape pré-analytique

IV- 2 - 2 – Méthodes de dosages

IV – 2 – 2 - 1 – Les tests fonctionnels

IV – 2 – 2 - 2 – Les méthodes immunologiques

IV – 2 - 3 – Etude de la capacité des cellules à sécréter des cytokines.

IV – 2 - 4 – Détermination des cytokines au niveau cellulaire

IV – 2 - 4 – 1 – Immunohistochimie

IV – 2 - 4 – 2 – Cytométrie en flux

IV – 2 - 4 – 3 - Détection des messagers

IV-3 Dosage des proteines de la phase aigue de l'inflammation

EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ : OBJECTIFS

Niveau A :

- **sérum : définition**
- **interprétation des résultats en fonction de la clique, de l'âge**
- **antisérums polyclonaux, monoclonaux : définition**
- **électrophorèse et immunoélectrophorèse/immunofixation des protéines sériques : toujours couplées à l'examen des urines si suspicion de gammapathie monoclonale**
- **chez l'enfant : pas d'indication de l' immunoélectrophorèse/immunofixation, dosges pondéraux des immunoglobulines interprétés en fonction des normes pour un enfant du même âge**
- **titre d'un auto-anticorps**
- **facteur rhumatoïde : définition**
- **lymphopénie, lymphocytose**
- **phénotypage lymphocytaire**
- **tableaux des valeurs normales et des CD à retenir**
- **complément : valeurs de référence de C3, C4, C1inhibiteur**

Niveau B :

- **examen clinique**
- **antisérums polyclonaux, monoclonaux : avantages, inconvénients, utilisation**
- **électrophorèse des protéines sériques : principaux profils d'exploration des gammaglobulines**
- **connaître les techniques de dosages pondéraux : néphélémétrie, Mancini**
- **principe de l'immunoélectrophorèse/immunofixation**
- **principe de l'immunofluorescence directe et indirecte**
- **notion de CD**
- **cytométrie en flux : principe**
- **complément : profils d'activation**
- **cytokines : grands principes de l'exploration**

EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ

I - SEMEIOLOGIE CLINQUE

L'examen clinique comporte, comme dans les autres spécialités, un **interrogatoire** précis et un **examen physique** exhaustif.

I-1- Interrogatoire

Il précise les dates et modes de début de la maladie, les modalités évolutives et les signes fonctionnels et généraux d'accompagnement (asthénie, fièvre, dyspnée, douleurs...). Il doit rechercher, de manière quasi policière, la prise ou l'exposition à des xénobiotiques (médicaments, toxiques physiques ou chimiques, professionneles ou alimentaires), un contact infectieux ou parasitaire. Il ne doit pas oublier la recherche d'éventuels antécédents familiaux.

I-2- Examen clinique

Il va explorer les organes lymphoïdes et les tissus hématopoïétiques, puis les autres appareils.

I-2-1-L'examen ostéomédullaire

Il consiste à palper les divers segments osseux, à la recherche de **tuméfactions** ou de **douleurs** provoquées.

I-2-2-L'examen des ganglions

Il doit être systématique, à la recherche de leur hypertrophie. On examinera successivement les aires cervicales, sous-mentales, sous-maxillaire, parotidiennes, spinales, jugulaires (hautes et basses), axillaires, épitrochléenne, rétrocrurales, inguinales, poplitées. En présence d'**adénopathies** (ganglions hypertrophiés), il y a lieu de préciser, en les reportant sur un schéma corporelle, daté et conservé dans le dossier clinique, leurs localisations, leurs nombres, leurs tailles et leur caractéristiques : sensibles ou non, dures ou molles, libres ou entourées de périadénite.

I-2-3-L'examen de la rate

Il se fait par la palpation et la percussion.

La palpation s'effectue sur un patient en décubitus dorsal, le médecin du côté droit. La main droite du médecin, préalablement réchauffée, est posée à plat sur le flanc gauche du patient. On demande au malade de respirer plus profondément que normalement. Le bord inférieur d'une rate hypertrophiée (**splénomégalie**) vient buter contre les doigts, ce qui n'est pas le cas d'une rate de volume normal.

Pour la percussion le médecin place sa main gauche, réchauffée, les doigts étendus, sur la partie latérale de l'hémithorax gauche d'un malade en décubitus latéral gauche, de façon à couvrir les espaces intercostaux. Le médius de la main droite percute chaque doigt de la main gauche : une rate de volume normal donne une submatité entre la 9ème et la 11ème côte. Une splénomégalie augmente cette aire de submatité, qu'il importera de rapporter sur un calque daté et conservé dans l'observation.

I-2-4-L'examen du foie

Il se fait par la palpation et la percussion.

La palpation s'effectue sur un patient, respirant calmement mais profondément, en décubitus dorsal, la paroi abdominale bien relachée, les membres inférieurs demi-fléchis. On recherche dans l'hyponchondre droit et l'épigastre, le bord inférieur du foie, dont on apprécie le siège, la consistance et la morphologie.

Pour la percussion le médecin place sa main gauche, réchauffée, les doigts étendus, sur la partie latérale de l'hémithorax droit d'un malade en décubitus dorsal, de façon à couvrir les espaces intercostaux. Le médius de la main droite percute chaque doigt de la main gauche. La percussion permet de localiser assez précisément le bord supérieur du foie. La percussion franche du thorax se fait de haut en bas. Le foie se traduit par une submatité qui succède à la sonorité pulmonaire. Un épanchement pleural peut géner l'appréciation exacte de la localisation du bord supérieur. Une **hépatomégalie** (hypertrophie du foie) augmente cette aire de submatité, qu'il importera de rapporter sur un calque daté et conservé dans l'observation.

I-2-5-Autres examens

Il importe d'examiner soigneusement la cavité buccale, la langue, les gencives et les amygdales de même que la peau et les phanères, à la recherche de signes de carence ou spécifiques de certaines pathologies (macroglossie de l'amylose, alopécie du lupus...).

L'examen clinique sera complet et intéressera tous les appareils, car nombre de pathologies dysimmunitaires sont pluri-systémiques (lupus, p.e.).

II- EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ HUMORALE SPÉCIFIQUE

Le terme d'**immunité humorale** désigne l'ensemble des mécanismes de défense retrouvés dans la phase liquide extraite du sang coagulé (**sérum**). Il regroupe les effecteurs de l'immunité humorale **spécifique** (ou adaptative), que sont les anticorps produits par les lymphocytes B, et ceux de l'immunité **naturelle**, principalement le complément et les cytokines, dont les interférons, mais aussi les protéines de la phase aiguë.

II-1- MATÉRIEL D'ÉTUDE

Par définition l'étude de l'immunité humorale se fait sur du **sérum**, qui correspond au plasma défibriné.

Le prélèvement se fait sur un tube sec, le contact du verre déclenchant la coagulation. Après 2 à 3 heures d'exsudation, le tube est centrifugé et le sérum surnageant recueilli et réparti en autant de fractions aliquotes que d'examens à effectuer. Si les examens sont réalisés rapidement (dans les 24 à 48 heures), ces fractions peuvent être conservées à + 4° C, si non il est préférable de les congeler à - 20° C.

Pour certaines explorations, notamment certains dosages du complément, il est parfois préférable de prélever le sang sur un agent chélateur du calcium, l'ethylènediamine tétraacétique acide (EDTA), qui bloque toute activation du système complémentaire. On travaille alors sur du plasma.

Cette exploration repose sur un certain nombre d'examens qui visent à doser les effecteurs sériques de l'immunité spécifique. Certains sont réalisables par des laboratoires de biologie polyvalente, d'autres ne le sont que par des laboratoires d'immunologie. On doit respecter une **hiérarchie de prescription,** allant du plus simple et du plus informatif au plus sophistiqué.

Pour tous les dosages pondéraux les résultats sont interprétés en fonction de **normes de population du même âge.** Il faut donc garder en mémoire que ces normes sont calculées pour un intervalle de confiance de 95 %; autrement dit, 5 % de la population normale se situe en dehors de ces normes.

Enfin il faut se souvenir que les dosages pondéraux représentent l'image ponctuelle d'un **équilibre** entre d'une part un anabolisme, et d'autre part un catabolisme et d'éventuelles autres pertes. Ainsi une hypogammaglobulinémie peut aussi bien se voir au cours d'un déficit immunitaire que d'une perte protéique digestive par lymphangiectasie.

C'est souligner également l'importance des **renseignements cliniques qui doivent impérativement accompagner les prescriptions**. En effet l'interprétation correcte des résultats de bon nombre d'examens d'immunologie et la décision de poursuivre les analyses nécessitent la connaissance du contexte clinique qui a motivé la demande.

Ainsi la décision de poursuivre l'analyse immunoélectrophorétique d'un sérum au delà du simple examen avec le seul antisérum anti-humain polyvalent peut se justifier s'il y a une forte suspicion de myélome: en effet en cas de myélome à chaînes légères, sans hypogammaglobulinémie majeure, ce premier tracé peut paraître normal.

II-2 Les différentes sources d'anticorps.

Au laboratoire la réaction antigène-anticorps peut être utilisée selon deux grands axes : soit la mise en évidence, la caractérisation et le titrage des anticorps dans le sérum des patients, soit la caractérisation d'antigènes dans des mélanges complexes, liquides, cellulaires ou tissulaires.

On distingue deux types d'antisérums

II-2-1 Antisérums polyclonaux

Les anticorps engendrés au cours d'une immunisation naturelle ou expérimentale, vis-à-vis d'antigènes multivalents, sont un mélange de molécules d'immunoglobulines qui diffèrent par leurs spécificités, leurs isotypes, leurs affinités. Cette hétérogénéité est liée à la production d'anticorps différents par autant de clones de lymphocytes B qu'il y a d'épitopes différents et accessibles sur l'antigène. Produit de la sécrétion de plusieurs clones, un tel antisérum est qualifié de **polyclonal**.

Plusieurs inconvénients entachent l'utilisation des antisérums polyclonaux, qui ont pourtant été les seuls disponibles jusqu'à la fin des années 70 et ont donc permis de poser les fondements de l'immunochimie.

Le premier est le manque de reproductibilité. Même lorsqu'ils proviennent d'animaux génétiquement identiques, immunisés avec la même préparation antigénique selon le même protocole d'immunisation, chaque antisérum est différent d'un animal à l'autre. Ils ne sont donc pas interchangeables.

En deuxième lieu les antisérums ne peuvent être produits qu'en quantité limitée, même si l'augmentation de la taille de l'animal immunisé (souris, rat, lapin, chèvre, cheval) permet d'augmenter le volume des saignées.

Enfin même des anticorps purifiés par chromatographie d'affinité ne sont pas exempts de contamination par des populations mineures d'anticorps de spécificité non relevantes, ceci même après plusieurs séquences d'absorption. Un exemple classique en est la difficulté d'obtention d'anticorps polyclonaux spécifiques des différentes sous-classes d'IgG.

Ce sont les raisons pour lesquelles l'obtention en quantité illimitée de molécules d'anticorps de structure homogène et de spécificité unique a longtemps été la quête du Graal des immunologistes, qui a finalement aboutit avec les travaux de Köhler et Milstein sur les hybridomes.

II-2-2 Antisérums monoclonaux

Les **hybridomes**, producteurs d'anticorps monoclonaux, sont obtenus par fusion de cellules spléniques de souris, immunisées par un antigène donné, avec des cellules myélomateuses murines.

La fusion se fait en utilisant du polyéthylèneglycol. Les cellules spléniques sont incapables de survivre longtemps en culture, à la différence des cellules myélomateuses dont la capacité à croître indéfiniment en culture est un des caractères du phénotype malin.

Les cellules spléniques apportent à l'hybride de fusion l'information codant pour produire les anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt. Les cellules myélomateuses sont soigneusement sélectionnées d'une part pour leur caractère non sécrétant, de façon à ce que les seuls anticorps produits par les cellules de fusion soient d'origine splénique, d'autre part pour leur sensibilité au milieu HAT qui permet de sélectionner les seuls hybrides. Les cellules myélomateuses sont déficitaires en enzyme hypoxanthine-guanosine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Ce déficit enzymatique empêche la transformation de l'hypoxanthine en inosine monophosphate, lequel ne peut être obtenu que par synthèse endogène qu'il est alors facile de bloquer en ajoutant de l'aminoptérine sous forme de milieu HAT (hypoxanthine-aminoptérine-thymidine). Ainsi au bout de quelques heures seuls survivront les hybrides immortalisés qui ont hérités du gène HGPRT fonctionnel des cellules spléniques.

Il faut après procéder au clonage qui vise à sélectionner les hybrides qui produisent des anticorps contre les épitopes de l'antigène immunisant. Ce clonage se fait à partir d'une cellule unique grâce à la méthode de dilution limite.

Par la suite cet hybridome peut être cultivé, soit en flasque in vitro, soit in vivo sous forme d'ascite après injection intra-péritonéale chez des souris histocompatibles: ceci permet d'obtenir de grandes quantités d'anticorps après purification à partir des surnageants ou des ascites.

Les anticorps monoclonaux, qui sont le plus souvent **non précipitants** ont peu d'applications dans les techniques de précipitation. Ils sont par contre plus fréquemment utilisés dans des techniques en **phase solide** (radioimmunologie, **ELISA**) dont les seuils de détection beaucoup plus sensibles (de l'ordre du µg/L) sont plus adaptés aux composants faiblement représentés (IgE par exemple).

II-3 Electrophorèse des protéines sanguines

L'électrophorèse des protéines sériques permet à la fois une exploration qualitative et quantitative, après intégration. Sa réalisation sur couche mince d'agarose donne une meilleure résolution que sur support classique d'acétate de cellulose.

Elle sépare en plusieurs fractions les protéines sériques selon leur charge électrique : sous l'influence d'un champ électrique, les protéines migrent vers les électrodes avec une vitesse variable, du pôle négatif vers le pôle positif, ce qui permet de distinguer :

- l'albumine (40 g/L)
- les 91-globulines (3 g/L)
- les 92-globulines (6 g/L)
- les 9-globulines (10 g/L)
- les 1-globulines (13 g/L)

La connaissance de la vitesse de migration des protéines sériques permet d'individualiser différents types de tracé. Ainsi migrent dans les :

- 91-globulines :
    * l'orosomucoïde
    * l'91-anti-trypsine
    * l'91anti-chymotrypsine
    * la SAA
- 92-globulines :
    * l'haptoglobine
    * la céruloplasmine
- 9-globulines :

* le fibrinogène
* les IgA pour partie

- 1-globulines :
  * la CRP
  * les immunoglobulines

Les 92-**globulines** sont souvent les plus augmentées en cas de **syndrome inflammatoire.**

L'analyse électrophorétique des protéines sanguines est le premier examen à demander pour évaluer la réponse immunitaire humorale.

Pour ce qui est de l'exploration des immunoglobulines on peut distinguer quatre types de profil électrophorétique, qui guideront en fonction de la clinique, la poursuite des investigations:

- zone **normale** (aspect polyclonal) des gammaglobulines, de 6 à 14 g/L
- **hypogammaglobulinémie**, faisant suspecter un déficit immunitaire, primitif ou secondaire, ou une perte (digestive, urinaire) et nécessitant à tout le moins une quantification par le dosage pondérale des immunoglobulines.
- **hypergammaglobulinémie polyclonale**, qui nécessite elle aussi une mesure, et qui, en fonction du contexte clinique, peut entraîner des investigations supplémentaires afin d'affirmer une pathologie auto-immune.
- **pic** dans la zone des gamma ou des bétaglobulines, déclenchant la prescription des examens diagnostiques des syndromes lymphoprolifératifs

L'immunoglobuline monoclonale donne, en règle, une bande étroite (**pic électrophorétique**) en raison de son homogénéité de charge, généralement dans les 9- ou les 1-globulines.

L'enregistrement densitométrique est plus difficile à évaluer que la simple analyse du tracé : une augmentation des 92- ou des 9-globulines est parfois interprétée à tort comme un pic.

La séméiologie électrophorétique des **immunoglobulines monoclonales** se résume à deux signes :

- un **pic,** qu'il est préférable de quantifier par intégration, plutôt que par néphélémétrie, mais qui n'est pas toujours visible
- une **hypogammaglobulinémie** résiduelle secondaire, qui peut être isolée (protéine de Bence Jones indétectable dans le sérum, IgA monoclonale masquée dans les 9-globulines. **Toute hypogammaglobulinémie, chez un sujet de 45 ans et plus, doit faire rechercher une immunoglobuline monoclonale, qu'il y ait ou non un pic à l'électrophorèse.**

Les principaux pièges sont :

- la présence de fibrinogène

- l'augmentation des 92- ou des 9-globulines (transferrine, composant C3 du complément, 9-lipoprotéines)

- pic masqué dans les bêta (petite IgA monoclonale) : dans ce cas la baisse des IgA résiduelles peut attirer l'attention, sous forme d'une décoloration trop accentuée de la zone 91.

- absence de pic en cas d'immunoglobuline monoclonale à activité cryoprécipitante pour non respect des conditions de prélèvement

- existence de formes diversement polymérisées d'une immunoglobuline monoclonale, responsables de plusieurs pics

- complexation de l'immunoglobuline monoclonale à d'autres protéines, lui faisant perdre son homogénéité de charge : 91-anti-trypsine pour les chaînes légères, facteurs rhumatoïdes monoclonaux.

En conclusion rappelons qu'**une électrophorèse sérique normale n'exclut pas le diagnostic d'Immunoglobuline monoclonale** : une chaîne légère libre en petite quantité peut

n'être détectée que dans les urines. C'est dire toute l'importance des **renseignements cliniques** et de l'**analyse conjointe des urines.** La prescription, argumentée par le clinicien, de recherche d'Immunoglobuline monoclonale impose de poursuivre l'analyse, même si l'électrophorèse sérique semble normale.

II-4 Dosage des immunoglobulines

Ces dosages concernent les trois isotypes principaux des immunoglobulines, à savoir **IgG, IgA** et **IgM.** Ils peuvent s'effectuer par **néphélémétrie** (le plus souvent) ou par **immunodiffusion radiale** dans des plaques commerciales. De manière tout à fait exceptionnelle on peut également doser l'IgD, par néphélémétrie.

*La **néphélémétrie** mesure la dispersion d'une lumière monochromatique, émise par une source laser ou non, entraînée par la formation de complexes immuns. En néphélémétrie on suit l'évolution de la formation de tels complexes. Les mesures se font dans la partie de la courbe en excès d'anticorps.*

La source lumineuse peut être une lampe quartz-iode dont la longueur d'onde d'émission est fixe ou bien une source laser rigoureusement monochromatique. La lumière dispersée est filtrée puis mesurée dans son intensité après amplification du signal par un photomultiplicateur ou une photodiode.

*Les échantillons à doser ainsi que les antisérums doivent être rigoureusement **limpides** : "qualité néphélémétrique" des antisérums. En cas de sérums troubles il est nécessaire de les filtrer ou d'utiliser un agent clarifiant.*

Cette technique permet de mesurer de nombreuses protéines dans le sérum humain, dans les limites de son seuil de sensibilité (0,5 mg/mL). Elle est automatisable, permettant le traitement de nombreux échantillons. Dans le champ de l'immunologie son utilisation en pratique courante permet les dosages des isotypes majeurs des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM et accessoirement IgD), de certains composants du complément (C3, C4, C1-inhibiteur et facteur B), des facteurs rhumatoïdes.

L'immunodiffusion radiale selon la méthode de Mancini est une immunodiffusion simple bidimensionnelle.

*On fait diffuser un antigène soluble dans un plan au sein d'un gel contenant l'anticorps correspondant, qui doit donc être précipitant et, le plus souvent pour cette raison, de nature polyclonale. La réaction antigène-anticorps aboutit à la formation de complexes insolubles visualisés sous forme d'anneau. Cette réaction n'est pas stoechiométrique : elle est caractérisée pour chaque sysème par un rapport optimal entre les concentrations respectives d'antigène et d'anticorps donnant une précipitation maximale (zone d'**équivalence**). Selon la relation de Mancini, la surface de l'anneau de précipitation au point final de diffusion, donc le carré du diamètre, est proportionnelle à la concentration en antigène.*

Les concentrations sériques moyennes des trois isotypes principaux chez l'adulte sont:

- IgG = 800 - 1500 mg/dL
- IgA = 110 - 415 mg/dL
- IgM = 60 - 190 mg/dL

Compte tenu de l'évolution différente des isotypes en fonction de l'âge, **les résultats pour l'enfant doivent être rendus en fonction de normes adaptées à l'âge de l'individu exploré.**

Il faut donc se rappeler que l'IgM est le premier isotype à atteindre les normes de l'adulte à l'âge de 2 à 3 ans, suivi par l'IgG à l'âge de 5 à 7 ans et enfin l'IgA à la puberté, alors que seules les IgG franchissent le placenta et que donc le nouveau-né a le même taux d'IgG que sa mère. Ces IgG maternelles vont dispaître en 4 à 6 mois.

*L'interprétation des dosages des immunoglobulines par néphélémétrie chez un patient ayant une **immunoglobuline monoclonale** doit être faite avec prudence. Il peut arriver, en raison du caractère polyclonal*

des antisérums utilisés, que le dosage de l'isotype correspondant à l'immunoglobuline monoclonale soit exagérément minoré, parce que les épitopes spécifiques de cette immunoglobuline particulière ne sont pas reconnus par l'antisérum. Ceci se voit plus volontiers en cas d'IgM monoclonale. Il est donc préférable d'utiliser les dosages obtenus par intégration de la courbe d'électrophorèse pour suivre l'évolution d'un pic, et de ***réserver les dosages pondéraux à l'évaluation des immunoglobulines résiduelles.***

II-5 Dosage des anticorps spécifiques

Ces explorations ne sont demandés qu'en deuxième intention, lors de l'exploration d'un déficit immunitaire de l'immunité humorale déjà documenté. On peut observer cependant des déficits profonds de certaines réponses anticorps (notamment anti-polysaccharides bactériens) contrastant avec des taux normaux d'immunoglobulines.

Il est habituel de rechercher et de titrer, en fonction du groupe sanguin ABO, les **hémolysines naturelles** anti-A ou anti-B qui sont de nature IgM avec un titre supérieur ou égal au 1/8ème, et les anticorps de classe IgG développés contre les anatoxines vaccinales (anticorps **anti-tétaniques**, **anti-diphtériques**, etc...).

II-6 Immunoelectrophorèse et immunofixation du sérum et des urines

Cette technique a été mise au point par Grabar et Williams dans les années 50. Il s'agit d'une réaction d'**immunoprécipitation en mileu gélifié**. Le premier temps consiste en une migration électrophorétique en gel d'agarose après dépôt de la solution à analyser dans un puits. A la fin de la migration une rigole transversale est creusée dans la gélose et un antisérum y est déposé. Ce deuxième temps immunologique consiste donc en une double diffusion dans un plan perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique.

Aux zones d'équivalence respectives il se forme autant d'arcs de précipitation qu'il y a de système antigène-anticorps. Initialement les protéines sont séparées selon leur charge, et se répartissent selon le profil électrophorétique habituel, des plus négatives au plus positives : albumine, 91-, 92-, 9- et 1- globulines. L'utilisation d'antisérums globaux, reconnaissant toutes les protéines du sérum humain, permet ensuite de démembrer chaque groupe en visualisant les arcs respectifs de précipitation. L'analyse peut être poursuivie, en cas de pic à l'électrophorèse, en utilisant des antisérums spécifiques des chaînes lourdes et des chaînes légères des immunoglobulines, affirmant ainsi la nature monoclonale de l'immunoglobuline produite en quantité telle qu'elle est responsable du pic.

Cette analyse est toujours effectuée en comparaison avec un sérum humain normal, et **l'étude du sérum doit toujours être couplée à celle des urines en cas de suspicion de gammapathie monoclonale.**

En effet, dans les 10 à 15 % de myélome à Bence Jones, il peut arriver que la chaîne légère monoclonale sérique ne soit pas détectable, car trop minime et n'entraîne pas d'hypogammaglobulinémie conséquente; seule l'analyse des urines permet alors de redresser le diagnostic en visualisant un important pic correspondant aux chaînes légères d'un seul type.

L'immunoélectrophorèse (IES) est une méthode d'analyse **purement qualitative**, au délai de réponse long de par sa méthodologie (trois jours), difficilement automatisable et nécessitant une grande expertise pour sa réalisation et son interprétation.

Pour ces différentes raisons l'immunoélectrophorèse tend de plus en plus à être remplacée par l'**immunofixation** qui est une variante méthodologique qui a l'avantage d'être plus rapide (délai de réponse en une journée), un peu plus sensible et en partie automatisable.

La première étape est identique et consiste en une migration électrophorétique du sérum dans un gel d'agarose. La deuxième étape, proprement immunologique, diffère, puisque l'anticorps spécifique est déposé à la surface du gel dans lequel il va pénétrer. Un précipité va se former s'il y rencontre son antigène. Après lavage le précipité est coloré par un colorant spécifique des protéines. Cette technique est principalement

utilisée pour caractériser les immunoglobulines monoclonales. Elle a comme principale inconvénient, comparée à l'immunoélectrophorèse, de totalement ignorer l'exploration des protéines sériques autres que les immunoglobulines.

Compte tenu du caractère qualitatif de cet examen et de l'évolution des taux des différents isotypes en fonction de l'âge, il est aisé de comprendre qu'il y a peu d'indications pédiatriques à l' analyse immunoélectrophorétique. **Chez l'enfant mieux vaut prescrire des dosages d'immunoglobulines.**

II-7 Recherche d'auto-anticorps

La recherche des auto-anticorps s'effectue le plus souvent en première intention par **immunofluorescence** (**IF**). Cette technique utilise des **fluorochromes:**

*Ce sont des substances qui ont pour propriétés d'émettre une fluorescence dans le visible lorsqu'elles sont excités par une lumière dans les longueurs d'onde de l'ultra-violet. Trois sont d'utilisation courante: l'**isothiocyanate de fluorescéine (FITC)**, la **phycoérythrine (PE)** et la **rhodamine**. Couplés à des anticorps, ils sont utilisés dans des techniques d'immunofluorescence dont la lecture peut se faire soit au microscope équipé en épiillumination, soit grâce à un automate analyseur de cellules (cytométre en flux).*

L'immunofluorescence peut être **directe** (**IFD**) ou **indirecte** (**IFI**).

Directe par immunohistologie elle permet d'identifier et de localiser des substances antigéniques sur des coupes tissulaires, qui doivent être congelées et non immergées dans les fixateurs habituels, dont l'emploi interdit toute étude d'immunofluorescence ou d'immunoenzymologie ultérieure.

Indirecte, en fonction du substrat, elle est particulièrement utilisée pour la recherche de nombreux auto-anticorps. Elle utilise un substrat, d'origine humaine ou animale, contenant l'auto-antigène cible. Celui-ci subit deux incubations de 30 minutes successivement avec le sérum du patient, puis avec un antisérum animal dirigé contre les immunoglobulines humaines, couplé à un fluorochrome, le FITC le plus souvent. Tout auto-anticorps fixé sur le substrat est révélé par l'anti-immunoglobulines et sera visualisé par lecture au microscope à fluorescence équipé en illumination.

Directe ou indirecte, elle est à la base de l'analyse des antigènes membranaires de différenciation des lymphocytes (appelé phénotype) par cytométrie en flux.

La recherche des auto-anticorps s'effectue le plus souvent en première intention par IFI. L'utilisation de différents types de substrats (coupes congelées d'organes de rat, de cobaye, voire de singe, ou cellules humaines en culture telles que les cellules HEp-2 [carcinome laryngé]) permet la mise en évidence des différents auto-anticorps dont on précisera le **titre** et l'**aspect** de fluorescence.

Eu égard à l'hétérogénéité des immunoglobulines au sein desquelles s'expriment quelques clones auto-immuns, les résultats de ces test d'IFI ne peuvent être rendus en unité de masse. On est obligé de définir une valeur seuil au-delà de laquelle la fluorescence observée avec le sérum étudié est significativement différente de l'aspect donné par un sérum humain normal, et considérée comme positive. Le **titre** de l'anticorps se définit comme **l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive**.

L'interprétation d'une recherche positive doit **tenir compte de l'âge**: si la présence d'anticorps anti-nucléaire, détectés par IFI sur cellules HEp-2, au titre du 1/100ème est quasi physiologique chez un adulte âgé, il n'en est pas de même chez l'enfant. L'interprétation des fluctuations de titre doit être prudente.

La recherche de la spécificité antigénique de certains auto-anticorps se fait en deuxième intention par d'autres techniques (ELISA, immunodot ou immunoempreintes). Cette caractérisation peut avoir une importance diagnostique (anticorps anti-Sm et lupus, anticorps anti-protéinase 3 et maladie de Wegener).

I-8 Facteurs rhumatoides

Les **facteurs rhumatoïdes** (**FR**) sont des auto-anticorps, de classe IgM le plus souvent, dirigés contre le fragment Fc des IgG complexées, initialement décrits dans un rhumatisme inflammatoire articulaire chronique, la **polyarthrite rhumatoïde**. Leur recherche se faisait classiquement selon deux méthodes:

- la **réaction de WAALER-ROSE** qui met en présence le sérum du malade avec des hématies de mouton recouvertes d'anticorps de lapin, de classe IgG, anti-globules rouges de mouton, à dose non agglutinantes.
- le **test au latex** dans lequel le système révélateur est constitué par des particules de latex recouvertes d'IgG humaines.

Actuellement, la recherche des FR se fait par plusieurs techniques qui n'utilisent pas la même méthodologie et ne détectent donc pas le même type de FR. Outre la méthode de WAALER-ROSE et le test au latex, citons l'immunonéphélémétrie avec des particules de polystyrènes recouvertes de complexes immuns formés d'IgG humaines et d'anticorps de mouton anti-IgG humaines. Dans le cadre de l'exploration d'un rhumatisme inflammatoire chronique la prescription de la recherche des FR s'accompagne de celle d'un syndrome inflammatoire. Leur étude étude sera plus détaillée dans le cours de DCEM I (*Explorations biologiques en immuno-rhumatologie*)

II- EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE SPÉCIFIQUE

Toutes les réponses immunitaires adaptatives sont le fait de lymphocytes, qu'ils soient T ou qu'ils soient B. Aussi toute étude de l'immunité se doit d'étudier la composante cellulaire de la réponse immunitaire, sous son aspect **quantitatif** et **qualitatif**.

Le premier temps consiste à évaluer le nombre de lymphocytes présents dans la circulation sanguine et sa répartition en sous-populations fonctionnnellement distinctes. Ceci constitue ce que l'on appelle le **phénotypage lymphocytaire**. Il faut bien garder présent à l'esprit que, si les lymphocytes sanguins sont d'obtention aisée, ils ne sont pas forcément représentatifs du système lymphoïde, car seuls les lymphocytes recirculant se retrouvent dans la circulation sanguine.

Le deuxième temps consiste, sur des cellules séparées, à analyser *in vitro* leur fonctions.

II-1 MATÉRIEL D'ÉTUDE

L'étude des populations lymphocytaires nécessite de prélever le sang sur un **anticoagulant**, afin d'éviter que les cellules ne soient emprisonnées dans le caillot sanguin, ce qui arrive quand le prélèvement est effectué sur un tube sec. Les anticoagulants les plus utilisés sont l'héparine (pour son action anti-thrombine) et l'EDTA (chélateur du calcium indispensable à la coagulation).

Les lymphocytes sont le plus souvent isolés après centrifugation du sang périphérique dilué sur un gradient de Ficoll et de métrizamide. On obtient ainsi à l'interface une couche de cellules mononucléées sanguines, correspondant majoritairement aux lymphocytes et aux monocytes débarassés des globules rouges et de la plupart des polynucléaires.

Un préalable indispensable à toute étude des populations lymphocytaires est la réalisation d'une **numération formule sanguine**, qui renseignera sur le chiffre absolu de lymphocytes par mm^3. Nous rappelerons que les lymphocytes représentent 28 à 32% des leucocytes, soit 1600 à 2400/mm^3, chez l'adulte. On parle de **lymphopénie** pour des chiffres inférieurs à 1500/mm^3, de **lymphocytose** pour des chiffres supérieurs à 3000/mm^3. Chez le

jeune enfant il existe une lymphocytose relative, et ces chiffres sont respectivement de 3000/mm^3 et de 9000/mm^3.

II-2- Cytométrie en flux

En microscopie optique avec les colorations cytologiques usuelles, rien ne permet de différencier les différentes sous-populations de lymphocytes. Les nombreux antigènes de différenciation qui sont exprimés à la surface des sous-populations des cellules immunocompétentes ne sont pas discriminés par les colorations cytologiques.

Le développement de la technologies des hybridomes a permis l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces antigènes. Lorsqu'ils reconnaissent le même antigène, rigoureusement identifié et caractérisé sur le plan protéique, fonctionnel et génique, ces anticorps sont regroupés dans ce que l'on nomme un **CD** (pour "cluster of differentiation", ou groupe de différenciation).

Par abus de langage les immunologistes utilisent indifféremment le terme CD pour aussi bien désigner l'antigène reconnu (ex: antigène CD4) que les différents anticorps monoclonaux qui reconnaissent cet antigène, au lieu de les désigner par le vocable anti-CD (on parlera de lymphocytes marqués par le CD4, alors qu'il faudrait dire par l'anti-CD4, ou exprimant le CD4 [antigène]).

Ces anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes permettent des études en IFD, dont la lecture peut se faire soit au **microscope**, soit à l'aide d'un automate, le **cytomètre en flux.**

L'avantage de la première méthode est de permettre un contrôle morphologique des cellules étudiées. Son principal inconvénient est le temps nécessaire à l'analyse d'un petit nombre de cellules.

Le **cytomètre en flux** est un outil remarquablement performant qui permet, grâce à une informatique intégrée, de détecter et comptabiliser un grand nombre de cellules, qui se résument cependant en de simples spots sur l'écran. En l'absence de contrôle morphologique, l'analyse des données doit donc être particulièrement rigoureuse.

Les cellules marquées sont pulsées à travers un étranglement sous forme d'un flux de cellules individuelles qui passent à travers un rayon laser. Des photomultiplicateurs détectent la dispersion de la lumière, ce qui traduit la taille et la granulosité de la cellule, et les émissions de lumière colorée émise par les différents fluorochromes. Les deux premiers paramètres permettent d'identifier les différentes populations cellulaires (lymphocytes, monocytes et polynucléaires), ce qui permet ensuite, après sélection ("fenêtrage") grâce à l'outil informatique de se limiter à une seule population (lymphocytes) pour l'analyse de la fluorescence. L'emploi d'un seul anticorps marqué permet de mesurer le pourcentage de la population cellulaire exprimant cet antigène de différenciation. Le résultat peut être visualisé sous la forme d'un histogramme à une couleur, avec deux pics de cellules correspondant aux cellules marquées et non-marquées, ou d'un nuage de points. L'existence de fluorochromes émettant à différentes longueurs d'onde dans le visible permet des études simultanées à deux, trois, voire quatre couleurs. Dans le cas le plus fréquent d'une étude biparamétrique on peut ainsi définir quatre sous-populations de cellules: celles qui expriment seulement un des deux marqueurs, celle qui exprime les deux et celle qui n'en exprime aucun.

Les principaux antigènes de différenciation explorés en pratique usuelle, et les résultats normaux du phénotypage lymphocytaire sont résumés en annexe.

II-3- Exploration du CMH

cf cours du *Docteur G Renier*

III- EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ HUMORALE NATURELLE

III-1 Exploration du complément

L'étude du complément se fait le plus souvent sur du **sérum.**

Deux types de mesures sont effectuées en pratique courante.

Des méthodes de **dosage immunochimique** permettent de quantifier individuellement les différents composants du complément.

Des **tests fonctionnels**, basés sur l'étude de la réaction d'**immunohémolyse** permettent de mesurer l'activité hémolytique globale ou d'un seul composant du complément.

III-1-1 Dosages pondéraux des composants du complément

La néphélémétrie est une méthode de dosage adaptée et reproductible pour les composants fortement représentés dans le sérum (C3, C4, B, C1-inhibiteur) avec un coût final moindre que celui de l'immunodiffusion radiale.

Les concentrations sériques moyennes de ces composants sont:

- C3 = 50 - 105 mg/dL
- C4 = 15 - 45 mg/dL
- facteur B = 15 - 35 mg/dL
- C1-inhibiteur = 15 - 35 mg/dL

III-1-2 Activité fonctionnelle

Les dosages hémolytiques mesurent l'activité fonctionnelle du système du complément. Les dosages du CH50 et de la VAH50 apprécient l'activité fonctionnelle globale de la voie classique (CH50) et de la voie alterne (VAH 50) en mesurant la lyse de globules rouges hétérologues en présence du sérum à tester, dans des conditions expérimentales définies où soit seule la voie classique, soit seule la voie alterne sont susceptibles d'être activées

III-1-2-1 voie classique

L'activité fonctionnelle de la voie classique, CH50, est mesurée par une réaction d'immunohémolyse dont le principe est le suivant : une quantité fixe de globules rouges de mouton (GRM) est sensibilisée à 37°C par une quantité fixe d'anticorps de lapin anti globules rouges de mouton (hémolysine ou sérum hémolytique, SH). Ces érythrocytes sensibilisés (EA pour "érythrocyte - antibody") sont ensuite incubés à 37°C avec le sérum à tester : l'activation du complément va conduire à la lyse d'une partie des EA qui va être quantifiée par la quantité d'hémoglobine libérée. Ceci est possible car l'action du complément est non spécifique d'espèce : le complément d'une première espèce peut lyser les cellules d'une deuxième sensibilisées par les anticorps d'une troisième. Cependant le pouvoir hémolytique est variable au sein des espèces : il est ainsi puissant chez le cobaye, mais faible chez le cheval, le mouton et le boeuf.

III-1-2-2 voie alterne

Le dosage fonctionnel de la voie alterne (VAH50 pour voie alterne 50 % ou AP50 pour "alternative pathway 50 %") repose sur le même principe que celui du CH50 à l'exception de deux éléments :

- le système révélateur utilise des globules rouges de lapin qui sont des activateurs directs de la voie alterne du complément dans le sérum humain : ils n'ont donc pas besoin d'être sensibilisés par des anticorps.

- pour éviter l'activation possible de la voie classique on met à profit le fait que le calcium n'intervient que pour celle-ci alors que la présence du magnésium est indispensable aux deux voies. On utilise un tampon EGTA (éthylène glycol bis 2-aminoéthyléther tetracetic acid) additionné de magnésium car il complexe 106 fois mieux le calcium que le magnésium.

Dans ces conditions expérimentales seule la voie alterne est fonctionnelle.

III-1-2-3 intérêt diagnostique

L'étude du complément au laboratoire d'Immunologie en pratique courante repose sur une exploration fonctionnelle et un dosage du C3, du C4 et éventuellement du facteur B. On se trouve alors devant plusieurs profils d'activation complémentaire qui parfois permettront d'élucider l'étiopathogénie de certaines maladies et qui nécessiteront la réalisation de dosages plus sophistiqués.

Le premier profil est celui d'une **activation de la voie classique** avec CH50, C3, C4 abaissés, alors que l'AP50 et le facteur B sont normaux. C'est ce que l'on peut voir dans les maladies par complexes immuns.

Le deuxième est celui d'une **activation de la voie alterne** : C3, facteur B, AP50 abaissés, C4 et CH50 normaux. Ceci est rencontré dans les glomérulonéphrites membrano-prolifératives de type II, les lipodystrophies partielles, les chocs septiques.

Le troisième correspond à une **activation des deux voies** : tous les dosages sont abaissés. Ceci se voit fréquemment dans le lupus.

Enfin il faut rappeler le profil particulier de l'**activation de la voie classique en phase fluide** au cours d'un **déficit en C1 Inh** : C4 abaissé, CH50 indosable, C3 et AP50 normaux.

III -2 METHODES D'EXPLORATION DES CYTOKINES

L'utilisation de techniques de dosage sensibles et précises dans de bonnes conditions de prélèvement est un prérequis indispensable à la bonne utilisation des cytokines en pratique clinique.

III- 2 - 1 – Etape pré-analytique

Trois principaux facteurs sont susceptibles d'influencer la qualité des résultats :

- la dégradation des cytokines au cours de la conservation
- la production cellulaire ou le relargage de cytokines après le prélèvement
- la liaison des cytokines à leurs récepteurs membranaires.

Pour les prélèvements sanguins il est préférable d'utiliser des tubes EDTA stériles : on travaille donc sur du plasma. Le chélateur a pour fonction d'inhiber la production potentielle de cytokine après le prélèvement. L'héparine, souvent souillée par des endotoxines, est un mauvais choix d'anti-coagulant, car capable d'induire une production in vitro. Pour les tests fonctionnels cependant les cations divalents sont le plus souvent indispensables, interdisant l'utilisation de l'EDTA : on travaille donc sur sérum. Il est conseillé de congeler immédiatement le prélèvement (à – 80°C de préférence) en plusieurs fractions aliquotes et d'éviter les séquences congélation/décongélation.

III- 2 – Méthodes de dosages

La découverte des cytokines s'est faîte sur la base de leurs propriétés biologiques : historiquement les premiers tests développés pour les doser ont donc été des tests fonctionnels. Désormais ils sont le plus souvent supplantés par des méthodes de dosage immunologiques soit dans le sang, soit dans les surnageants de culture de cellules activées. De plus en plus se développent des méthodes de quantification intracellulaire soit dans les tissus (immunohistochimie), soit dans les cellules par cytométrie en flux, soit au niveau de l'ARN messager pr hybridation *in situ* ou par RT-PCR.

III – 2 – 1 – Les tests fonctionnels

Ils reposent sur l'existence de lignées cellulaires ayant une activité quantifiable (prolifération, cytotoxicité, etc…) en réponse à une cytokine donnée.

L'inconvénient majeur est un manque de spécificité, en partie lié à la redondance des cytokines. La lourdeur méthodologiques de ces tests, souvent longs et peu reproductibles, explique qu'ils soient d'utilisation restreintes aux laboratoires qui les maîtrisent parfaitement.

III – 2 – 1 – Les méthodes immunologiques

Ces méthodes reposent sur l'existence d'anticorps monoclonaux qui permettent des dosages antigéniques radioimmunologiques ou de type ELISA.

De nombreuses trousses de dosages commerciales existent, qui pour beaucoup fonctionnent sur le mode d'un Elisa sandwich : toute la fiabilité du dosage repose sur la qualité de l'anticorps de capture.

Le principal inconvénient de cette technique est d'être antigénique, et donc de ne fournir aucun renseignement sur l'aptitude fonctionnelle de la cytokine dosée.

La deuxième difficulté est représentée par les très faibles quantités de cytokines circulantes. En effet ces médiateurs sont principalement des molécules à destinée locale, tissulaire, dont les taux sériques n'atteignent des valeurs détectables (pg/mL) que dans de très rares circonstances pathologiques.

III – 2 - 3 – Etude de la capacité des cellules à sécréter des cytokines.

En raison de la faible concentration plasmatiques des cytokines, il est souvent préférable de tester les capacités sécrétrices de cellules mises en cultures en présence d'activateurs : lipopolysaccharides bactériens (LPS), lectines végétales comme la phytohémagglutinine (PHA), ou un mélange d'ester de phorbol (PMA) et de ionophore de calcium (ionomycine). Il est désormais possible d'effectuer cette stimulation en sang total. Il est toujours nécessaire de techniquer en comparaison un sujet supposé sain. La capacité de production des cytokines peut être appréciée par les dosage Elisa dans le surnageant de culture ou par une technique d'Elispot : la culture des cellules acitvées se fait dans une microplaque recouverte d'un anticorps de capture spécifique de la cytokine d'intérêt. Après une incubation dont la durée optomum est variable pour chaque cytokine, les cellules sont éliminées par lavage. La cytokine capturée est révélée par un deuxième anticorps marqué. Cette technique est plus sensible que l'Elisa classique.

III – 2 - 4 – Détermination des cytokines au niveau cellulaire

La détection des cytokines dans les cellules productrices peut être obtenue à deux niveaux :

- protéique dans les tissus par immunohistochimie ou dans les cellules en suspension par cytométrie en flux
- détection des messagers par hybridation in situ ou par RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

III – 2 - 4 – 1 – Immunohistochimie

Cette méthode nécessite trois étapes : une fixation et une perméabilisation des coupes tissulaires, le plus souvent par un mélange paraformaldéhyde-saponine, et la détection des cytokines par un anticorps marqué soit par un fluorochrome, soit par une enzyme.

La principale difficulté repose sur la sélection des anticorps monoclonaux utilisables dans cette technique : de plus la faible concentration intra-cytplasmique des cytokines limitent son application.

III – 2 - 4 – 2 – Cytométrie en flux

L'analyse cytométrique de cellules stimulées permet de pallier la faible production spontanée de cytokines à condition de bloquer l'excrétion des cytokines, par des agents comme la monensine. Après fixation et perméabilisation des cellules il est non seulkement possible de quantifier les cellules productrices de cytokines, mais même, en réalisant des marquages multiples avec des fluorochromes différents, d'avoir une information sur le type de cellules productrices.

III – 2 - 4 – 3 - Détection des messagers

La détection des messagers par hybridation in situ ou par RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)

III-3 Dosage des proteines de la phase aigue de l'inflammation

Le dosage de ces protéines, et principalement celui de la protéine C réactive, se fait par néphélémétrie.

RESUME

Les examens immunologiques, comme tous les examens biologiques, doivent être prescrits et interprétés en fonction du contexte clinique. L'interprétation correcte des premiers résultats et la décision de poursuivre les analyses nécessitent une parfaite connaissance du contexte clinique.

L'exploration de l'immunité humorale vise à quantifier et à apprécier la fonctionnalité des mécanismes humoraux, présents dans le sérum, des réponses immunitaires humorales naturelles et adaptatives ainsi qu'à rechercher des signes de dysfonctionnement de ces réponses.

L'étude de la réponse immunitaire humorale adaptative repose sur le dosage des immunoglobulines dont le taux est apprécié en fonction de normes pour l'âge du sujet testé, et l'étude des activités anticorps naturelles (hémolysines) et induites par vaccination. Les anomalies qualitatives, dépistées à l'électrophorèse des protéines sériques, sont analysées par l'immunoélectrophorèse du sérum (ou l'immunofixation) qui se doit impérativement d'être couplée à l'étude des urines en cas de suspicion de gammapathie monoclonale. Dans le cadre des maladies auto-immunes, la recherche, la caractérisation et le titrage des différents auto-anticorps sont souvent une aide précieuse au diagnostic, voire à la surveillance, à condition de se rappeler que l'analyse du titre et de ses variations doit tenir compte de l'âge et des modalités opératoires des différentes techniques.

L'exploration humorale de l'immunité naturelle repose essentiellement en pratique courante sur le dosage de certaines protéines de la phase aigue de l'inflammation et sur l'analyse quantitative et qualitative du complément. Les dosages des cytokines restent du domaine de la recherche clinique.

L'exploration de l'immunité cellulaire spécifique repose, au plan quantitatif, sur l'analyse des marqueurs de différenciation membranaires identifiés au sein de la classification des CD. Elle est faite à l'aide d'un automate, le cytomètre en flux , qui , en fonction de la nature des anticorps utilisés, donne le phénotypage lymphocytaire.

POUR EN SAVOIR PLUS

Preud'homme JL Exploration des immunoglobulines et des anticorps sériques *Rev Prat (Paris)* 1991, **41:** 777-81.

Gangloff S La réaction antigène-anticorps in Genetet N (ed) *Immunologie* EMinter/CNED 2002 : 747-775.

Picot C, Genetet N Cytofluorométrie analytique in Genetet N (ed) *Immunologie* EMinter/CNED 2002 : 777-798.

GENETET N Exploration de l'immunité cellulaire in GENETET N (ed) *Immunologie* EMinter/CNED 2002 : 799-823.

JANEWAY CA, TRAVERS P Induction, mesure et manipulation de la réponse immune *Immunobiologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1997 : 53-108.

REVILLARD JP *Immunologie* DeBoeck Université/Belin Bruxelles 1998: 389-424.

BENE MC, FAURE GC. *Exploration fonctionnelle de l'immunité humorale* EMinter, Cachan 1997

VALEURS NORMALES

ADULTE

DOSAGE NÉPHÉLÉMÉTRIQUES:

IgG = 780 - 1500 mg/dl

IgA = 110 - 415 mg/dl

IgM = 60 - 190 mg/dl

C3 = 50 - 105 mg/dl

C4 = 15 - 45 mg/dl

Chez l'*enfant* : normes **en fonction de l'âge** pour les **immunoglobulines**

PHÉNOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE:

lymphocytes = 28 - 32 % soit 1600 - 2400/mm^3

lymphocytes T (CD3) = 67 - 76 % soit 1100 - 1700/mm^3

lymphocytes T CD4 = 38 - 46% soit 700 - 1100/mm^3

lymphocytes T CD8 = 31 - 40% soit 500 - 900/mm^3

lymphocytes B (CD19) = 11 - 16% soit 200 - 400/mm^3

cellules NK (CD16 + 56) = 10 - 19% soit 200 - 400/mm^3

CD À RETENIR

CD2 : récepteur des globules rouges de mouton, marqueur de tous les lymphocytesT
molécule d'adhérence (ligand : LFA-3 ou CD58)

CD3 : constitué de 5 chaînes: 1, 1, 1, 1 et 1, obligatoirement associé au TCR.
donc marqueur pan-T

CD4 : marqueur de la sous-population de lymphocytes T auxiliaires ou "helper"
se lie à la partie constante des molécules HLA de classe II

CD8 : marqueur de la sous-population de lymphocytes T cytotolytiques/suppresseurs
se lie à la partie constante des molécules HLA de classe I

CD16 : récepteur Fc1RIII
marqueur des cellules NK

CD19 : marqueur spécifiques des lymphocytes B

CD23 : récepteur Fc1RII
existe aussi sous forme soluble

CD25 : chaîne 9 du récepteur de l'interleukine-2
marqueur d'activation cellulaire

COTATION DES EXAMENS DU LABORATOIRE D'IMMUNOPATHOLOGIE

❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀❀

IMMUNOCHIMIE

		REFER. NOM.
. IMMUNO-ELECTROPHORESE DU SERUM.....	**B 180**	**1571-1572**
Pour les Consultations externes ou Laboratoires extérieurs ou CHR extérieurs : en cas d'étude de plusieurs anti-sérums ne compter au maximum que B 220		
. IMMUNO-ELECTROPHORESE DES URINES (Protéine de Bence-Jones).....	**B 180**	**1619**
. DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES :		
. IgG.....	**B 40)**	
. IgA.....	**B 40)**	**1385**
. IgM.....	**B 40)**	
. IgA seule.....	**B 40**	**1569**
Pour les Consultations externes, Laboratoires Extérieurs ouCHR extérieurs ne compter au maximum que B 100		
(Dosage des immunoglobulines incompatibles avec C3-C4 l'un ou l'autre)		
. DOSAGE DU COMPLEMENT :		
. C3.....	**B 40**	**1569**
. C4.....	**B 40**	**1569**
Si les deux demandes C3-C4 sont faites ne compter que...	**B 70**	**1570**
. DOSAGE DU COMPLEMENT TOTAL HEMOLYTIQUE (CH50).....	**B 40**	**316**
. INHIBITEUR DE LA C1-ESTERASE.....	**B 40**	**1569**
. IgA-TRANSFERRINE.....	**B 80**	**1569-0309**
. ALPHA1-ANTITRYPSINE.....	**B 40**	**1569**

. FACTEUR RHUMATOIDE.....B 40 1451

. CRYOGLOBULINE.....B 20 1573
. CRYOFIBRINOGENE..... B 20 HN
. BETA2 MICROGLOBULINE (sang).....B 70 0324
. ALPHA2 MACROGLOBULINE..... B 35 0989

IMMUNOPATHOLOGIE

		REFER. NOM.
. Anticorps anti-nucléaires.(Noyau, ANA).....	**B 40**	**1453**
. Anticorps anti-centromères.....	**B 40**	**1453**
. Anticorps anti-DNA LISA.....	**B 70**	**1455**
. Crithidia Luciliae.....	**B 40**	**1454**
. Anticorps dirigés contre les Antigènes nucléaires solubles (RNP, Sm, SSA, SSB) :		
. si NEGATIF.....	**B 40**	**1456**
. si POSITIF	**B 140**	**1457**
. Anticorps anti-RNP, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Jo1, anti-Scl70 par la méthode ELISA.....	**B 70**	**1458**
. Anticorps anti-TPO.....	**B 70**	**1487**
. Anticorps anti-estomac ou cellules pariétales gastriques...	**B 40**	**1490**
. Anticorps anti-facteur intrinsèque.....	**B 70**	**1491**
Anticorps anti-muscles lisses.....	**B 40**	**1466**
. Anticorps anti-muscles striés.....	**B 40**	**1498**
. Anticorps anti-mitochondries.(AMA).....	**B 40**	**1469**
. Anticorps anti-réticulum endoplasmique ou anti-microsomes ou LKM ou REL.....	**B 40**	**1472**
. Anticorps anti-réticuline.....	**B 40**	**1474**
. Anticorps anti-membrane basale.....	**B 40**	**1493**
. Anticorps anti-substance intercellulaire.....	**B 40**	**1494**
. Anticorps anti-saccharomyces cerevisiae (ASCA).....	**B 140 HN**	
. Anticorps anti-Kératine.....	**B 40**	**1464**
. Anticorps anti-Histone.....	**B 70**	**1459**
. Anticorps anti-endomysium.....	**B 40**	**1475**
. Anticorps anti-membrane basale glomérulaire.....	**B 40**	**1496**
. Transglutaminase.....	**B 70 HN**	

. Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ACPN, ANCA).....B 40 1462
. Anticorps anti-Myélopéroxydase. (MPO).....B 70 1463
. Anticorps anti-Protéinase3. (PR3).....B 70 1463

. BIOPSIE DE PEAU.....B 300 018

. Viscosité sanguine.....B 40 1104

IMMUNOLOGIE CELLULAIRE

. Groupage tissulaire A et B.....B 400 1180
. HLA-B27.....B 200 HN

. Lymphocytes T :
. CD4 ou T4.....B 40 1122
. CD8 ou T8.....B 40 1122
. CD4 + CD8 (T4 + T8) avec rapport.....B 80 1122
. Autres marqueurs en plus.....B 40 HN

. Phénotypage par cytométrie en flux (pour 8 anticorps au moins monoclonaux).....B 300 1103

TESTEZ-VOUS

🗁 Le nombre de lymphocytes B chez l'adulte normal est évalué en utilisant le marqueur

A - CD3
B - CD4
C - CD8
D - CD16
E - CD19

🗁 Chez un enfant suspect de déficit héréditaire de l'immunité humorale adaptative, quels sont les examens qui sont recommandés pour le diagnostic?

A: dosages pondéraux des immunoglobulines
B: électrophorèse des protéines sanguines
C: dosage des fractions du complément
D: immunoélectrophorèse des protéines sanguines
E: dosages des iso-hémagglutinines naturelles

🗁 Quelles sont, parmi les méthodes énumérées ci-dessous, celles qui sont habituellement utilisées pour le dosage des immunoglobulines sériques?

A: test de COOMBS
B: immunofixation
C: immunodiffusion radiale de MANCINI
D: réaction de WAALER-ROSE
E: néphélémétrie

🗁 L'une des techniques suivantes est une méthode courante d'analyse qualitative des protéines sériques par immunoprécipitation en milieu gélifié. Laquelle?

A: ELISA
B: immunoélectrophorèse
C: immunodiffusion radiale de MANCINI
D: cytométrie en flux
E: néphélémétrie

🗁 Parmi les composants du complément énumérés ci-dessous, quels sont ceux qui sont couramment dosés par néphélémétrie?

A: C3
B: facteur B
C: C4
D: facteur D
E: C1-inhibiteur