

## LE SYSTEME IMMUNITAIRE

### Principes généraux<sup>1</sup>

par Bernard RENTIER\*

*Département de Microbiologie, Unité de Virologie fondamentale et d'Immunologie. Tour de Pathologie B-23, Université de Liège au Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.*

#### RESUME

Tous les organismes sont confrontés au problème du maintien de leur intégrité. Des systèmes comportementaux parfois complexes sont des réponses aux agressions externes: la fuite, l'attaque, etc. Mais l'agression peut souvent être plus insidieuse, comme dans le cas d'une infection par un microorganisme, par exemple. D'autre part, la menace peut provenir de l'individu lui-même, au cas où certaines de ses cellules échappent au contrôle et à la coordination de l'organisme et forment alors des tumeurs ou cancers. En réponse à ces deux types de problèmes, les organismes multicellulaires ont élaboré des systèmes de protection, grâce à la spécialisation de certaines de leurs cellules dans la défense.

Les plus simples de ces systèmes se sont mis en place à partir de mécanismes et de propriétés qui existaient déjà chez les unicellulaires. En effet, ces derniers, comme les multicellulaires d'ailleurs, ont toujours dû se prémunir contre le risque de fusion avec d'autres individus, risque qui menace constamment leur intégrité. Lors de la formation des premières colonies de cellules, cette reconnaissance entre cellules de la même colonie était essentielle au maintien de l'identité du groupe. C'est à partir de cet «effort» pour ne pas se mélanger avec d'autres organismes que les systèmes de défense se sont élaborés.

La première ligne de défense des animaux est constituée par la peau, ses annexes et ses revêtements, ainsi que les muqueuses. Ces organes sont des barrières mécaniques entre l'individu et son environnement, mais ils sont également outillés pour protéger le corps contre les agressions par les microbes, virus et autres parasites qui abondent dans le milieu. Ces accessoires sont, par exemple, des substances bactéricides sur la peau, du mucus ou des sécrétions glandulaires sur les muqueuses, les cils vibratiles du système respiratoire, etc.

La deuxième ligne de défense est assurée par des cellules spécialisées dans la lutte contre les intrusions, et qui sont capables de circuler librement dans le sang et la lymphé, mais aussi dans les tissus, et d'y capturer les particules étrangères. Leur rôle dans la lutte contre les infections est donc considérable. Chez les Mammifères, ce sont les neutrophiles et les monocytes dans le sang, les macrophages et les histiocytes dans les tissus.

En plus de ces cellules phagocytaires, il existe d'autres leucocytes capables d'émettre des messages chimiques qui vont servir à attirer les phagocytes et d'autres cellules de la défense sur les lieux de l'agression. C'est le rôle des éosinophiles du sang et des mastocytes des tissus. Ces cellules, avec les phagocytes, vont contribuer activement au phénomène de l'inflammation.

La fonction de ces deux premières lignes de défense est strictement non spécifique, c'est-à-dire que la réponse est identique quelle que soit la nature de l'agresseur. Elle est stéréotypée.

Une troisième ligne de défense existe, mais seulement chez les Vertébrés, et elle se perfectionne beaucoup avec révolution de ces Vertébrés. La différence avec les systèmes de défense précédents est que celui-ci, le système immunitaire, est spécifique, c'est-à-dire qu'il est adapté à l'agresseur à combattre. Il est assuré par des leucocytes spécialisés, les lymphocytes, qui sont donc les effecteurs de la réponse immunitaire.

La spécificité de la réponse est due à la stéréocomplémentarité des molécules de la réponse immunitaire et des éléments étrangers. L'organisme dispose d'une très grande quantité (plusieurs dizaines de millions) de lymphocytes qui fabriquent, chacun, des molécules spécifiques d'une structure étrangère pouvant jouer un rôle d'agresseur. A chaque structure étrangère potentielle correspond donc un lymphocyte.

<sup>1</sup> Conférence donnée dans le cadre de la Journée d'Enseignement post-universitaire de Pharmacie. Sart Tilman, 20 mars 1988.

Certains lymphocytes gardent, dans leur membrane cytoplasmique, ces molécules qu'ils ont synthétisées et sont capables de détruire des cellules de l'organisme qui porteraient les structures étrangères (donc anormales) correspondantes à leur surface. C'est le cas des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales. Il s'agit d'une sous-population de lymphocytes T (car ils effectuent leur maturation dans le thymus) appelés lymphocytes T cytolytiques ou cytotoxiques.

D'autres lymphocytes sécrètent ces protéines au lieu de les garder dans leur membrane et les envoient ainsi dans le sang où elles pourront aller se fixer sur les corps étrangers correspondants. Ces protéines sont les anticorps et les lymphocytes sont des lymphocytes B (car ils effectuent leur maturation dans la moelle osseuse, en anglais: bone marrow).

Certaines sous-populations de lymphocytes T sont responsables du contrôle et de la coordination du système immunitaire. Ce sont les lymphocytes T régulateurs, qui peuvent être subdivisés en lymphocytes T «helper» ou auxiliaires, qui amplifient (ou tout simplement permettent) la réponse effectrice spécifique correspondante, et en lymphocytes T «suppressor» ou répresseurs qui ralentissent (ou empêchent) la réponse spécifique.

Le système immunitaire est un système à mémoire, car la deuxième agression par un agent étranger suscite une réponse plus rapide, plus intense et même plus précise que la première. C'est pour cette raison qu'on ne développe de maladie qu'à la première rencontre avec certains agents infectieux.

La collaboration entre les systèmes non spécifique et spécifique est une des grandes forces de notre défense. On la retrouve au niveau de l'action conjointe des anticorps et du complément, des cellules K ou des cellules à médiateurs.

Les produits de la réponse immunitaire, comme les anticorps, peuvent être utilisés à des fins extrêmement diverses. Cette utilisation constitue une part très importante de ce qu'on appelle aujourd'hui les biotechnologies.

## SUMMARY

### **The immune System - General considerations**

All organisms face the problem of maintaining their integrity. They respond to external aggressions by complex behaviors: runaway, hiding, attack, etc... However, aggression can often be more insidious, when it is internal, such as during a microbial infection. The threat can also rise from within the organism itself, when some of its cells escape surveillance and develop into tumors or cancers. Response to these dangers has been achieved in multicellular organisms by elaboration of protective systems, based on the specialization of particular cells towards defense.

The simplest systems originated from mechanisms and properties already present in unicellular organisms. Indeed, the latter, as well as multicellular organisms, have always had to avoid fusing with other individuals in order to preserve their integrity. When the first cell colonies formed, cell recognition within a colony became essential for the maintenance and survival of the group itself. All defense systems have evolved from this "effort" against mixing.

The first animal defense line is the skin and the mucosae, with their accessories. These organs are mechanical barriers between the organism and its environment, but they are also equipped to protect actively the body against aggressions by microbes, viruses and other parasites. Accessories are, for instance, bactericidal substances of the skin, mucus and other glandular secretions on mucosae, ciliae in the respiratory tract, etc...

The second line is taken in charge by specialized cells, able to move freely in blood and lymph, but also in tissues, and to catch foreign particles and ingest them by phagocytosis. Their role in the fight against infection is thus quite important. In Mammals, these cells are neutrophils and monocytes in blood, macrophages and histiocytes in tissues.

In addition to these phagocytic cells, other leucocytes send off chemical mediators which attract phagocytic cells and other defense cells to the aggression site. These mediator cells are eosinophils and basophils in blood and mast cells in tissues. Together with phagocytes, they contribute actively to the inflammation process.

These two lines of defense are strictly non-specific since the response they provide is always identical whatever the aggressor can be.

A third defense line is found in Vertebrates. As opposed to the previous ones, it is specific, in the sense that it is adapted to the aggressor. Cells responsible for this activity are specialized leucocytes called lymphocytes, the effectors of the immune response.

Specificity is due to stereocomplementarity of the immune response molecules and foreign elements. A large number (between 10 and 100 millions) of lymphocytes make original molecules specific for foreign molecules which can be potential aggressors. To each possible foreign structure corresponds one lymphocyte.

Some lymphocytes display in their plasma membranes glycoproteins (receptors) complementary to foreign structures. They are able to destroy cells of the organism itself when these cells display corresponding foreign structures. This happens when cells are infected by a virus whose antigens are inserted into the membrane, or when cells become tumoral and display tumor antigens at their surfaces. The lymphocytes involved in this process are T lymphocytes (so called because they mature in the thymus).

Other lymphocytes, rather than keeping their glycoproteins in their membranes, secrete them in blood where they can circulate and attach specifically to foreign structures. These glycoproteins are called antibodies and the corresponding lymphocytes are B lymphocytes (so called because they mature in bone marrow).

Some T lymphocyte subpopulations are responsible for the control and coordination of the immune system. They are called T regulatory cells and they can be subdivided into T-helper cells, which accelerate (and even allow for) specific effector (T and B) cell response, and T-suppressor cells, which slow down (and even suppress) specific responses.

The immune system is characterized by its "memory". A second aggression by a foreign agent provokes a much faster, stronger and more precise response as compared to the first one. This is why one develops clinical disease only upon the first encounter with some infectious agents.

Collaboration between non-specific and specific systems is a strong asset of our defense. It occurs when antibodies and complement, K cells or mediator cells cooperate.

Products of the immune response, such as antibodies, can be utilized for extremely diverse purposes, constituting a very important part of what is now called biotechnologies.

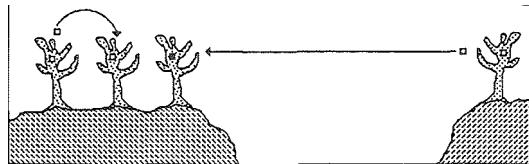
## INTRODUCTION

Le système immunitaire des vertébrés supérieurs est un ensemble complexe de cellules ayant chacune des fonctions propres et coopérant le plus souvent les unes avec les autres afin de protéger efficacement l'individu contre certaines agressions de l'environnement. Les anticorps, souvent présentés comme responsables de l'immunité, n'en sont, en réalité, qu'un aspect particulier.

Ce système complexe est le résultat d'une évolution des systèmes de défense accompagnant l'évolution des organismes vivants eux-mêmes. On peut considérer que, dès l'apparition des organismes unicellulaires, des systèmes de reconnaissance se sont élaborés afin de permettre à ces organismes de se reconnaître entre eux. Lors de la constitution de colonies simples d'unicellulaires, puis d'organismes multicellulaires, les phénomènes de reconnaissance sont devenus de plus en plus essentiels. La discrimination entre le soi (éléments d'un même organisme) et le non-soi (éléments étrangers) est devenue primordiale, et c'est ainsi qu'on voit se manifester, chez les descendants les plus primitifs de ces organismes, des phénomènes de tolérance et de rejet d'une remarquable sensibilité.

On constate par exemple, chez les Hexacoralliaires et les Octocoralliaires, que si l'on greffe un fragment de colonie sur la même colonie ou sur une colonie voisine, la greffe «prend». Elle est donc tolérée. Par contre, si la greffe se fait sur une colonie de la même espèce et de la même variété, mais géographiquement éloignée, le greffon sera rejeté. Ceci indique une sensibilité extrêmement grande et une capacité de déceler des différences intimes au niveau moléculaire (fig. 1).

**Fig. 1.** *Ches les Coralliaires, la transplantation d'un fragment de corail sur une colonie (de la même espèce) voisine est tolérée, alors que le même greffon est rejeté par une colonie (de la même espèce) située sur un récif géographiquement éloigné.*



L'étude détaillée de ce type de rejet a fait apparaître une observation très importante : lors du rejet du greffon par le receveur chez ces organismes primitifs, ce sont les cellules du receveur directement voisines du greffon qui dégénèrent et meurent, isolant ainsi le greffon de son nouvel environnement et provoquant le rejet. Il n'y a donc pas à proprement parler d'attaque du receveur contre le greffon, mais isolement de ce dernier par le sacrifice d'une couche cellulaire voisine de la greffe (le rejet de greffe chez les vertébrés est un phénomène différent, plus élaboré, faisant intervenir des cellules tueuses).

La conclusion extrêmement importante de ces observations et qui révolutionne les concepts de base de l'immunologie moderne est que la reconnaissance spécifique du soi est un phénomène permanent, essentiel à la survie même des cellules et que lorsque cette reconnaissance est interrompue (remplacement de la cellule voisine portant les caractéristiques du soi par une cellule de greffon, différente quant à ces caractéristiques) la cellule meurt.

Ultérieurement, les animaux ont développé des systèmes plus élaborés, où, bien que cette fonction de reconnaissance du soi soit maintenue dans toutes les cellules de l'organisme, certaines d'entre elles se sont spécialisées dans une réponse particulière à l'interruption de la reconnaissance du soi.

Les hémocytes des Arthropodes, par exemple, circulent dans l'hémolymphé et les tissus, prennent constamment contact avec les autres cellules de l'organisme, et lorsqu'un corps étranger les prive de l'information du soi en s'interposant entre eux et cette information, ils se mettent à réagir violemment en s'accollant à ce corps étranger pour le phagocytter. Si l'intrus est trop volumineux, l'hémocyte s'y accollera cependant, libérant des substances qui attirent d'autres hémocytes et l'élément étranger sera ainsi isolé et éliminé.

Ce type de réaction se retrouve partout dans l'échelle animale, jusqu'aux macrophages et aux cellules apparentées chez les Mammifères.

On constate donc que le système de défense des invertébrés, basé exclusivement sur la reconnaissance et la non-reconnaissance du soi, est un processus non-spécifique.

L'élaboration d'un système immunitaire proprement dit est la grande innovation des vertébrés, qui ont développé, parallèlement à un système de défense non-spécifique, une reconnaissance spécifique du non-soi.

Cette reconnaissance est assurée par des cellules spécialisées, les lymphocytes, qui synthétisent des récepteurs stéréocomplémentaires des structures portées par les agresseurs éventuels, et intègrent ces récepteurs dans leur membrane cytoplasmique (lymphocytes T) ou les sécrètent dans les fluides de l'organisme sous forme d'anticorps (lymphocytes B).

L'évolution du système immunitaire s'est développée dans le sens d'une plus grande spécificité, d'une plus grande rapidité et d'une meilleure mémoire. Elle s'est constituée à partir de systèmes cellulaires spécialisés dans d'autres usages (nutrition, rejet de déchets, reconnaissance cellulaire).

Cependant, il y a eu également conservation des systèmes ancestraux et coordination de ceux-ci avec les systèmes nouveaux.

L'évolution des espèces animales allant dans le sens de l'apparition d'organismes de grande taille, et dont le temps de génération s'est considérablement allongé, la stratégie de sélection naturelle s'est alors transposée du niveau population d'individus au niveau population de cellules, les cellules à division très rapide permettant d'accélérer l'adaptation. On a donc vu apparaître des mécanismes génératrices de diversité, mettant à la disposition de l'individu de très nombreuses possibilités de reconnaissance du non-soi. C'est alors sur ces cellules que s'est mise à opérer la sélection.

Cette évolution a nécessité l'intervention de très nombreuses cellules ayant des communications entre elles (information, régulation, etc.). Donc, il devenait indispensable de disposer d'organes où ces cellules entrent en contact et d'un système indépendant de circulation pour ces cellules: ce sont les organes lymphoïdes et le système lymphatique.

Ce système de défense spécifique chez les vertébrés porte le nom de système immunitaire car il procure, après une première rencontre stimulante avec un élément étranger, une immunité. En effet, dans le cas de maladies infectieuses, la mise en alerte du système immunitaire par l'agent infectieux assure, en général, la protection de l'individu contre une seconde maladie<sup>2</sup> due au même agent, s'il a survécu à la première.

L'immunologie est l'étude du fonctionnement de ce système immunitaire, des conditions dans lesquelles l'immunité est acquise et sous quelle forme, et des applications qu'on peut en déduire, à condition d'en comprendre les avantages et les limitations.

## L'ENVIRONNEMENT EN TANT QU'AGSESSSEUR

Devant les diverses menaces à son intégrité, tout organisme vivant réagit par l'élaboration de mécanismes de défense, tendant ainsi à maintenir son homéostasie. Ces menaces peuvent être classées essentiellement en quatre catégories :

1. la fusion entre organismes différents;
2. le traumatisme physique (blessure, mutilation);
3. le parasitisme (invasion par des organismes étrangers);
4. la néoplasie (croissance anormale de tissus tumoraux).

Les défenses déployées en réponse à ces menaces sont extrêmement diverses (fuite, agression, défenses internes). Nous nous préoccuperons ici uniquement des défenses que l'on peut appeler «intraorganismiques». Ces défenses apparaissent avec les organismes les plus simples et les plus primitifs.

Chez les procaryotes<sup>3</sup> et chez les végétaux, on connaît mal la nature des moyens de défense. On sait seulement que les végétaux sont capables de se défendre contre les agents pathogènes et de cicatriser leurs blessures, qu'ils contrôlent relativement bien leurs néoplasies, qu'ils produisent des antifongiques, qu'ils rejettent les greffes incompatibles et qu'ils possèdent des systèmes élaborés de restriction lors de la fusion de leurs gamètes.

En raison de cette quasi-ignorance générale, nous nous consacrerons donc au monde animal, et en particulier aux animaux multicellulaires.

## LES SYSTEMES DE DEFENSE

### MECANISMES GENERAUX

Le système interne le plus ancestral est non-spécifique, il ne reconnaît ce qui est étranger que parce qu'il est capable de reconnaître ce qui est soi (tout ce qu'il ne reconnaît pas est donc non-soi). Ce système persiste jusque chez les organismes les plus «évolués».

Les processus de défense groupés sous le terme général de système immunitaire impliquent la succession de trois phases importantes:

1. la reconnaissance du non-soi, permettant la distinction efficace entre soi et non-soi. Cette reconnaissance est assurée par des récepteurs, garants de la spécificité, qui fonctionnent sur la base de liaisons de stéréocomplémentarité.

Il suffit de reconnaître spécifiquement le «soi» (reconnaissance positive) pour être averti de la présence de «non-soi», qui est en fait une absence de «soi». Le récepteur est dit spécifique s'il reconnaît une seule

<sup>2</sup> Il ne s'agit pas d'une protection contre l'infection, mais contre un développement tel de celle-ci qu'elle provoque une maladie.

<sup>3</sup> A l'exception des enzymes de restriction chez les bactéries.

molécule, ou, comme c'est généralement le cas, s'il reconnaît un spectre de molécules semblables avec des affinités différentes.

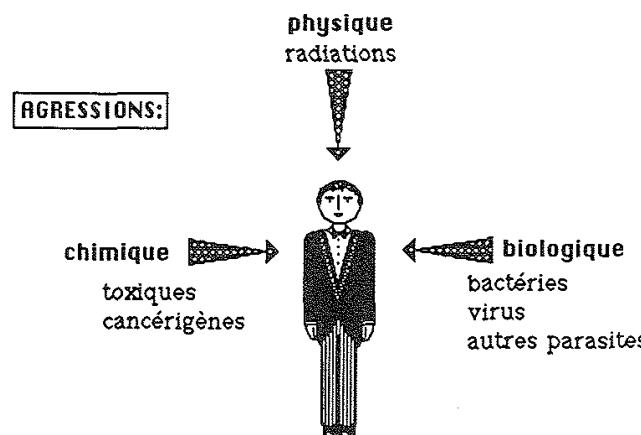
2. la «prise de conscience» cellulaire de cette reconnaissance, impliquant la transmission interne d'un signal biochimique et son analyse.

3. la réponse, visant à l'élimination du danger et pouvant prendre des formes diverses.

D'une manière générale, on peut considérer que les agressions par l'environnement auxquelles sont soumis les individus sont de trois ordres (Fig. 2):

- a) de nature physique (radiations etc.);
- b) de nature chimique (produits toxiques, cancérogènes, etc.);
- c) de nature biologique (parasites, substances antigéniques).

**Fig. 2. Les trois principaux types d'agression contre l'intégrité de l'individu.**



Ces différents types d'agression sont susceptibles de s'attaquer dans l'individu à des cellules particulières que nous appellerons les cellules-cible. Il va de soi que la cellule-cible sera différente pour chaque agression.

Les mécanismes de défense de l'individu vont réagir à l'agression, soit en s'interposant entre l'agresseur et la cible, soit en sacrifiant la cellule-cible elle-même lorsqu'elle aura été irrémédiablement modifiée et constituera une menace pour l'intégrité de l'individu.

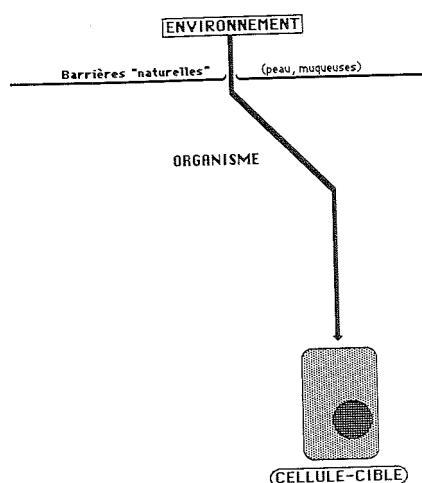
Ces mécanismes de défense sont passifs (barrières physiques, protections épithéliales, etc.) ou actifs (système immunitaire).

#### LA DEFENSE PASSIVE

Au niveau de la peau et des muqueuses, on dispose de systèmes de défense variés, opposant une barrière à la pénétration de corps étrangers. Ces épithéliums sont infranchissables, sauf par effraction. Ils sont, de plus, protégés chimiquement par des sécrétions (pH, etc.). Le système respiratoire est équipé de cils vibratiles et de mucus, le système digestif produit des enzymes, et son acidité contribue à sa protection (Fig. 3).

Les microorganismes symbiotiques que nous hébergeons dans notre intestin et qui constituent la flore normale assurent une antibiose locale. De même, le système génital dispose de ses propres protections naturelles : le vagin doit son acidité à des lactobacilles symbiotiques.

**Fig. 3. L'agression par des constituants de l'environnement.**



#### LA DEFENSE ACTIVE

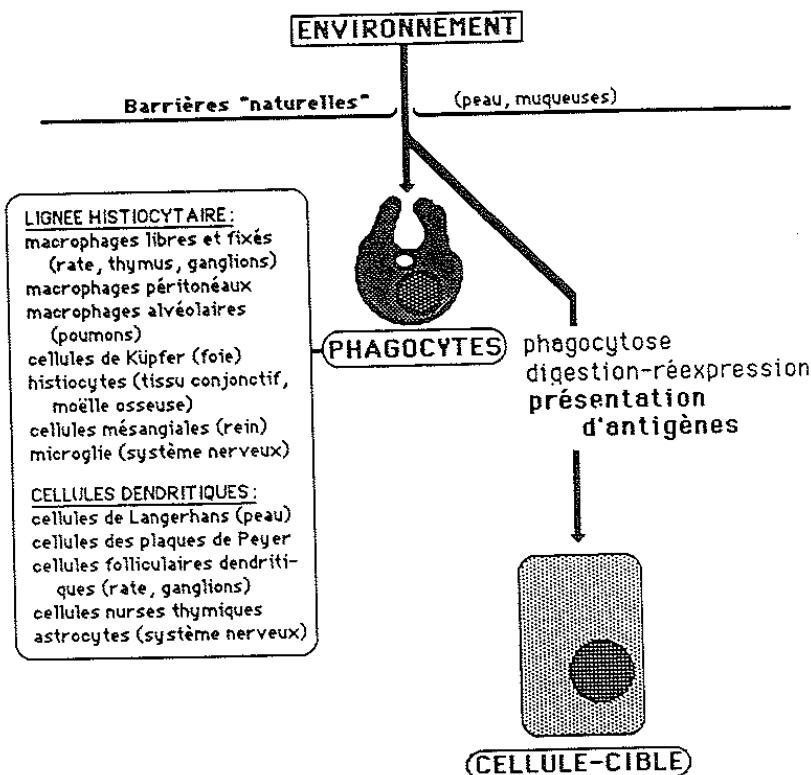
La défense active peut se subdiviser en deux grandes catégories : la défense non spécifique et la défense spécifique.

#### LA DEFENSE NON SPECIFIQUE

##### *Les phagocytes*

Si l'agression est provoquée par un élément particulaire (un microorganisme, par exemple) qui, après avoir franchi les barrières naturelles de protection, pénètre dans l'organisme, une catégorie de cellules spécialisées va s'interposer entre l'intrus et la cible et ingérer ou tenter d'ingérer celui-ci (Fig. 4).

**Fig. 4. Le système de défense non-spécifique : les phagocytes.**



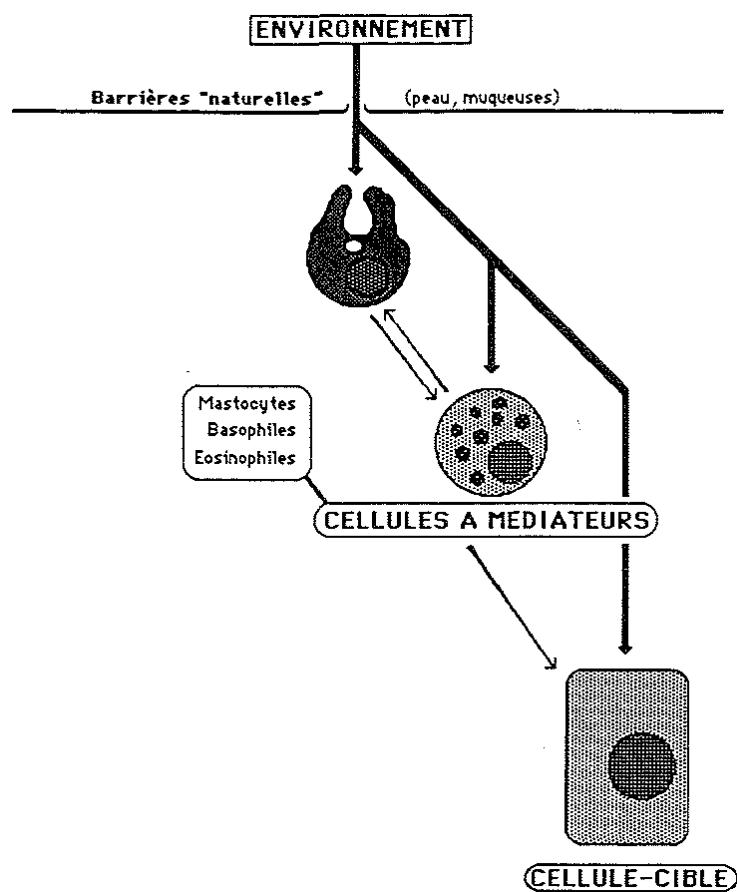
Ces cellules sont appelées phagocytes, en raison de leur activité phagocytaire importante. Outre le rôle qu'elles jouent dans l'élimination physique de l'agresseur, elles servent également de relais au déclenchement du système immunitaire spécifique, comme on le verra plus loin. Leurs représentants mobiles principaux sont le monocyte dans le sang et le macrophage dans les tissus. De nombreux représentants sont «fixés» et ne peuvent guère ou pas se déplacer. Ils portent des noms différents selon les organes et tissus, mais appartiennent tous à la lignée histiocytaire.

#### *Les cellules à médiateurs*

La pénétration d'un agent étranger dans l'organisme et sa rencontre avec des cellules spécialisées provoque la libération par ces cellules de diverses substances ou médiateurs chimiques contenus dans des vésicules intracytoplasmiques.

Ces cellules sont donc des cellules «à médiateurs». Les médiateurs ainsi libérés ont un effet direct sur l'agresseur, ou, plus généralement, sur les mécanismes physiologiques de l'individu (thermorégulation, vasodilatation, etc.) favorisant l'élimination de l'intrus ou tout au moins la résistance à l'agression par celui-ci. Certains médiateurs ont également pour effet d'activer la locomotion et/ou la phagocytose des phagocytes et de les appeler sur les lieux où leur présence est requise (Fig. 5).

**Fig. 5. Le système de défense non spécifique: les cellules à médiateurs.**



Les cellules à médiateurs sont principalement les mastocytes dans les tissus, les basophiles, et les éosinophiles dans le sang. Quant aux médiateurs les mieux caractérisés, ce sont l'histamine et les facteurs d'activation des macrophages (MAF).

Dans ces différents cas, il n'existe pas de véritable spécificité de la réponse à l'agression : relativement peu en ce qui concerne la reconnaissance de l'agresseur, si ce n'est son caractère étranger, et absolument pas pour ce qui est de la réaction, qui est standardisée. Toutefois, ceci n'enlève rien à son efficacité ni surtout à sa rapidité. C'est, de toute évidence, le système le plus ancestral de réponse à l'agression extérieure.

## LA DEFENSE SPECIFIQUE

Lorsque l'agresseur est porteur de structures antigéniques, c'est-à-dire de configurations moléculaires susceptibles d'être appariées à des configurations stériques complémentaires, l'invasion donne lieu à une réponse visant à éliminer spécifiquement l'agent étranger. La réponse spécifique est, par définition, plus lente, puisqu'elle exige, après la reconnaissance de l'agent étranger, la fabrication d'un système de défense « sur mesure », mais son efficacité et sa précision sont alors remarquables.

Une structure antigénique pénétrant dans un organisme et capable d'induire chez cet organisme une réponse immunitaire est appelée immunogène.

L'immunité spécifique peut être considérée comme une «invention» des vertébrés. Elle implique la participation de cellules spécialisées, les lymphocytes que l'on peut diviser en deux grandes catégories: Les lymphocytes B et les lymphocytes T. Ces deux sortes de lymphocytes ne sont reconnaissables, à l'heure actuelle, que par des critères antigéniques ou fonctionnels.

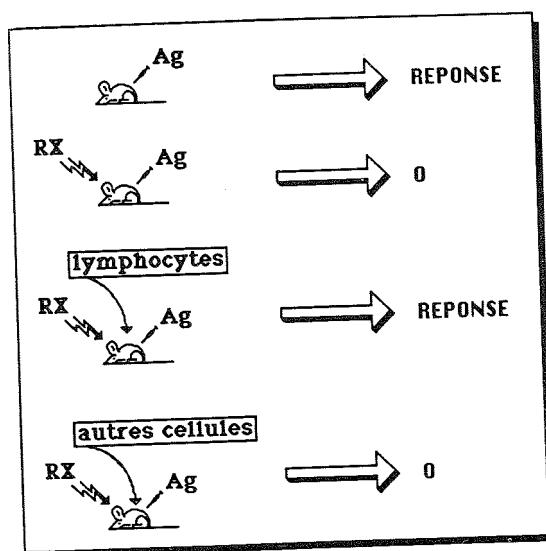
On a pu mettre en évidence le rôle des lymphocytes dans les réponses immunitaires par des expériences de transfert de cellules.

Lorsqu'on injecte un antigène à une souris, elle répond spécifiquement à cet antigène. Si au préalable, on irradie l'animal avec des rayons X (dose sublétale de 400 Rads), on supprime sa capacité à répondre. Toutefois, si on transfère à l'animal irradié des lymphocytes d'un animal syngénique non irradié, on restaure son aptitude à répondre, résultat qu'on ne peut obtenir avec le transfert d'autres cellules (Fig. 6).

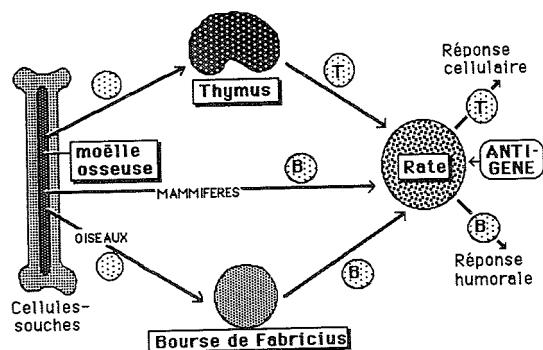
Les lymphocytes proviennent de cellules-souches qui se développent dans la moelle osseuse hématopoïétique, puis migrent dans des organes spécialisés pour y effectuer leur maturation définitive (Fig. 7).

Ces organes sont le thymus pour les lymphocytes T et un (ou des) organe(s) mal défini(s) pour les lymphocytes B chez les Mammifères (probablement la moelle osseuse elle-même), mais qui correspond(ent) à la bourse de Fabricius des Oiseaux.

**Fig. 6.** Démonstration du rôle des lymphocytes dans la réponse immunitaire.



**Fig. 7. Les itinéraires de la maturation lymphocytaire.**



Les lymphocytes T seront essentiellement circulants, bien qu'en trouve également beaucoup dans la rate et les organes lymphoïdes. Ils seront les effecteurs de la réponse immunitaire cellulaire.

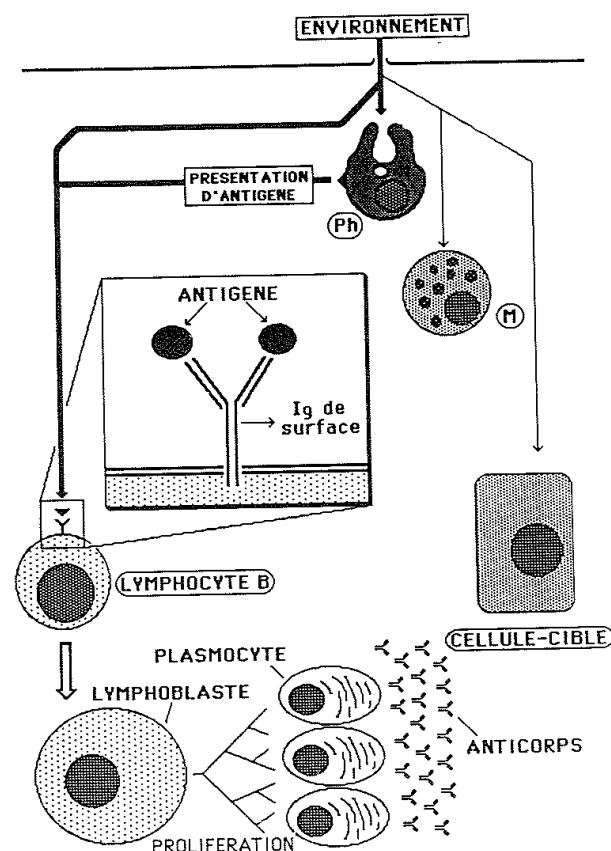
Les lymphocytes B sont localisés dans la rate et les organes lymphoïdes, et circulent très peu. Ils sont responsables de l'immunité humorale, c'est-à-dire la production des anticorps qui, eux, sont solubles et circulants.

## LES LYMPHOCYTES B ET LES ANTICORPS

### LA PRODUCTION DES ANTICORPS

Lorsqu'une conformation antigénique pénètre dans l'organisme, elle y est reconnue par un lymphocyte B, qui porte attachés à sa surface des immunoglobulines (Ig) qu'il a synthétisées lui-même, qui sont, par conséquent, toutes identiques, et dont l'extrémité qui se lie à l'immunogène est dirigée vers l'extérieur. L'immunogène se fixe donc sur cette immunoglobuline de surface du lymphocyte B (Fig. 8).

**Fig. 8. Les lymphocytes B et la formation des anticorps.**

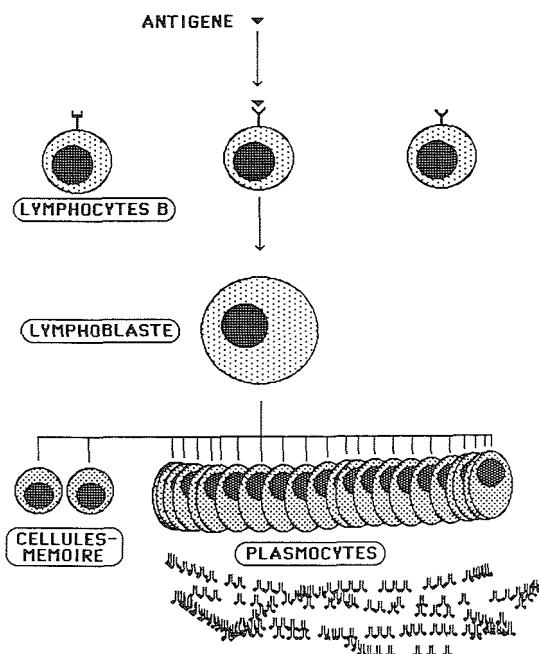


Cette reconnaissance spécifique a de nombreuses implications. En particulier, il existe chez un même individu, un répertoire complet d'immunoglobulines correspondant à toutes les conformations complémentaires possibles, appelées antigènes. En fait, bien que cette situation soit, à première vue, difficile à croire, elle est parfaitement concevable, comme nous le verrons plus loin, grâce à des phénomènes de recombinaison génétique et à un recouvrement partiel des spécificités antigènes-immunoglobulines.

Lorsque la rencontre entre l'immunogène et l'immunoglobuline de surface du lymphocyte B a eu lieu, elle déclenche, par un mécanisme biochimique faisant intervenir des modifications conformationnelles de l'immunoglobuline, la fluidité membranaire, les échanges cationiques et les nucléotides cycliques, un certain nombre de réactions au sein du lymphocyte.

Ces réactions conduisent à la transformation lymphoblastique et à la prolifération lymphocytaire. Ces phénomènes se caractérisent par une modification morphologique des lymphocytes en lymphoblastes, cellules de grande taille dans lesquelles le rapport volumétrique noyau/cytoplasme a fortement diminué, puis par une multiplication importante de ces lymphoblastes pour former une nombreuse descendance de plasmocytes, cellules dont le réticulum endoplasmique est hypertrophié, et qui ont une intense activité sécrétoire. Ces plasmocytes sécrètent en effet les anticorps, des immunoglobulines libres dont la spécificité est identique à celle des immunoglobulines de surface du lymphocyte B original (Fig. 9).

**Fig. 9. La stimulation des lymphocytes B et la prolifération clonale.**



Tous les plasmocytes descendant d'un même lymphocyte B original forment donc un clone cellulaire. Les immunoglobulines qu'ils sécrètent sont toutes identiques et sont dites monoclonales.

La production d'anticorps monoclonaux consiste donc à isoler un clone de plasmocytes produisant des anticorps de spécificité déterminée.

Une première rencontre avec l'antigène induit une réponse primaire, peu importante, essentiellement caractérisée par des immunoglobulines M (voir plus loin) et s'accompagnant de la mise en «réserve» de cellules-mémoire.

Une deuxième rencontre avec l'antigène entraîne une réponse secondaire ou anamnestique, plus rapide et plus importante, constituée principalement d'immunoglobulines G (ou A, voir plus loin), due à la prolifération des cellules-mémoire.

## LES ANTICORPS

TISELIUS a montré par électrophorèse que le sérum sanguin est composé essentiellement d'albumine et de globulines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ).

TISELIUS et KABAT ont ensuite démontré que, chez un animal immunisé, la teneur en  $\gamma$ -globulines augmente. Si le sérum de l'animal immunisé est absorbé par l'antigène d'immunisation, on observe un retour des  $\gamma$ -globulines à leur niveau normal. Les  $\gamma$ -globulines sont donc bien les molécules qui, dans le sang, ont la propriété d'être des anticorps.

Les anticorps sont des  $\gamma$ -globulines (toutes les  $\gamma$ -globulines ne sont pas des anticorps). Un sérum avant immunisation est appelé «sérum normal» ou «présérum». Un sérum après immunisation est appelé antisérum.

Les  $\gamma$ -globulines responsables de l'activité anticorps sont appelées immunoglobulines (Ig). Il y a  $10^{16}$  molécules d'immunoglobulines par ml de serum, et il en existe de  $10^6$  à  $10^9$  sortes différentes. Il est donc impossible de les étudier en détail car elles sont très hétérogènes. Pour ce type d'études, il est nécessaire d'obtenir des anticorps homogènes, soit à partir de plasmocytomes ou myélomes (néoplasmes, c'est-à-dire tumeurs des plasmocytes ou des lymphocytes, productrices d'énormes quantités d'anticorps monoclonaux, de spécificité inconnue), soit à partir d'hybridomes (cellules productrices d'anticorps monoclonaux de spécificité vérifiable, obtenues par manipulation expérimentale).

Cinq classes distinctes d'immunoglobulines ont été successivement découvertes, des années 30 aux années 60.

1) IgG (G pour *gamma*), découvertes les premières, dans les années 30.

Leur vitesse de sédimentation est de 7S.

2) IgM (M pour *macroglobulines*), découvertes en 1937 chez le cheval (auquel on avait inoculé un antigène polysaccharidique), ensuite chez l'homme en 1944, lors de l'étude d'un myélome qui sécrétait des Ig de cette classe. Trouvées enfin dans le sérum normal humain en 1956.

Leur rôle dans la réponse primaire est primordial. Leur vitesse de sédimentation est de 19S.

3) IgA (A pour  $\beta$  2A), trouvées en 1953 par analyse de l'électrophorèse de sérum: elles ont une vitesse de migration électrophorétique différente des G et M. Décelées ensuite systématiquement dans les sécrétions.

4) IgD, découvertes en 1965.

5) IgE, découvertes dans des sérum de patients allergiques en 1967.

L'unité de base de la molécule d'immunoglobuline est une protéine constituée de quatre polypeptides : 2 chaînes polypeptidiques lourdes : H = 50 Kd. 2 chaînes polypeptidiques légères : L = 25 Kd. reliés et stabilisés par des ponts disulfure.

Il existe de nombreuses variétés que l'on regroupe en catégories ou types:

- Les *isotypes*: ensemble d'Ig appartenant à la même classe et sous-classe (*voir plus loin*), identiques chez les individus d'une même espèce.

- Les *allotypes*: ensembles d'Ig variant entre individus différents d'une même espèce (variations individuelles). Plusieurs individus peuvent partager un allotype identique.

- Les *xénotypes*: ensembles d'Ig variant entre individus appartenant à des espèces différentes.

- Les *idiotypes*: ensemble d'Ig ayant toutes exactement la même spécificité pour l'antigène, donc la même partie variable de l'Ig, ou idiotype.

Chez l'homme, on reconnaît de nombreux isotypes d'Ig.

Les isotypes de chaînes lourdes sont au nombre de 9:

- gamma ( $\gamma$ ), mu ( $\mu$ ), alpha ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ).

- au sein de l'isotype  $\gamma$ , on distingue quatre sous-types  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ .

- au sein de l'isotype  $\alpha$ , on distingue deux sous-types:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ .

Ce sont eux qui déterminent la classe.

Il existe deux isotypes de chaînes légères :

- kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ ).

Seuls les isotypes de chaînes lourdes déterminent la classe et la sous-classe de l'immunoglobuline. Une même classe ou sous-classe peut donc porter indifféremment une chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ .

On ne rencontre jamais qu'un seul type de chaîne H et un seul type de chaîne L par immunoglobuline. Il y a donc 18 combinaisons possibles (9H et 2L).

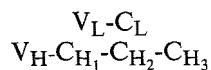
Une même molécule contient deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques (Fig. 10).

Pour une population polyclonale, la séquence polypeptidique d'un même isotype de chaîne légère est identique de l'acide aminé 107 à l'acide aminé carboxyterminal 214, mais elle varie fortement entre l'acide aminé aminoterminal et l'acide aminé 106.

On détermine donc une région variable (V) de 1 à 106 et une région constante (C) de 107 à 214. Dans la région V, on observe trois petites zones hypervariables (hv). Il en va de même sur la chaîne lourde, qui peut contenir quatre régions hypervariables.

Par conséquent, il existe quatre sortes de régions:  $V_L$ ,  $C_L$ ,  $V_H$  et  $C_H$ .

Les chaînes lourdes et légères des différents isotypes d'Ig sont constituées de domaines dont les séquences sont fort semblables (30% de similitude), de 110 à 120 acides aminés (10 à 12 Kd). Ces domaines dérivent en fait tous d'un domaine ancestral, codé par un gène qui s'est dupliqué de nombreuses fois dans l'évolution. La structure des chaînes d'immunoglobulines est donc modulaire :



Des ponts disulfure inter-chaînes unissent les chaînes lourdes entre elles ainsi que les chaînes lourdes et légères.

En outre, des ponts disulfure intra-chaînes replient les polypeptides sur eux-mêmes, formant ainsi des domaines globulaires.

La partie de l'Ig comprise entre la charnière formée par les ponts disulfure interchaînes lourdes et l'extrémité carboxy-terminale est appelée région Fc (pour *fraction cristallisable* après coupure par l'enzyme papaïne, fig. 10). Les deux « bras » amino-terminaux sont appelés F(ab) ou Fab (pour *fraction antigen-binding* obtenue après le même clivage enzymatique).

La majorité des informations que nous possédons sur la génétique des immunoglobulines provient d'études sur la souris. Les principes généraux peuvent cependant être extrapolés à l'homme sans grand risque de se tromper. Seuls les détails varient. Sauf mention expresse du contraire, nos exemples seront systématiquement choisis chez la souris.

Les gènes codant L  $\kappa$ , L  $\lambda$  et H sont situés sur trois chromosomes différents. Chez l'homme : H = chromosome 14;  $\kappa$  = chromosome 2;  $\lambda$  = chromosome 22.

Un lymphocyte B diploïde contient donc 2x3 chromosomes codant pour les Ig, mais ces gènes ne sont jamais exprimés que dans deux chromosomes à la fois:  $\kappa$  ou  $\lambda$ , et H. Chaque chromosome actif n'exprime qu'un seul gène (sauf au cours du développement).

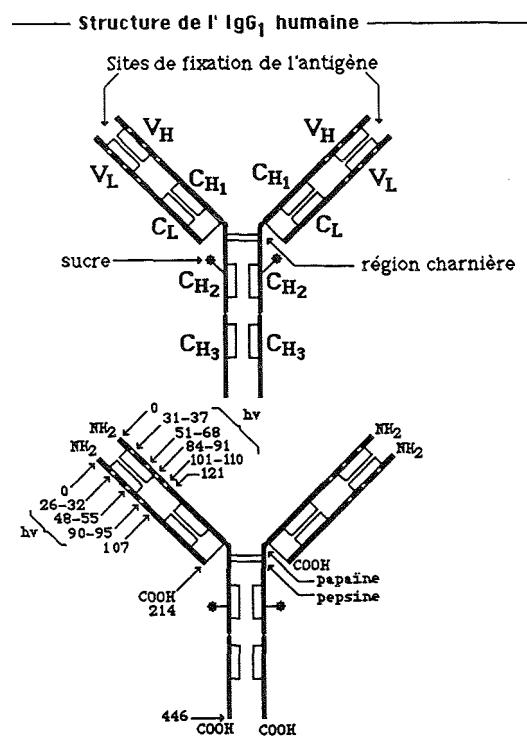
Il n'y a jamais qu'une seule sorte de chaîne L par lymphocyte (donc par Ig), mais les anticorps d'un individu sont un mélange des deux sortes.

Les régions variables et constantes des immunoglobulines sont codées par des gènes distincts. Les gènes des régions variables sont appelés V, ceux des régions constantes C. Ces gènes, pour une même chaîne, H ou L, sont situés sur un même chromosome, mais toujours séparés d'au moins 1.500 nucléotides.

La diversité des anticorps s'explique essentiellement par la conjonction de quatre mécanismes distincts.

- 1) La multiplicité des gènes V codant pour la région variable de l'Ig procure un véritable répertoire de quelques dizaines ou même centaines de gènes différents. On les appelle Vl-n. Chacun d'entre eux peut être «choisi» lors de la maturation du lymphocyte, et un seul est «choisi» par lymphocyte. Toutefois, cette multiplicité ne suffit pas à rendre compte de la diversité des régions variables d'Ig.
- 2) Des mutations somatiques affectent préférentiellement les gènes V, et ne sont pas réparées. Chaque clone de lymphocytes B contient donc des gènes uniques. Cette particularité ne suffit pas non plus, à elle-seule, à expliquer la diversité des anticorps.
- 3) Des recombinaisons somatiques entre les gènes V et d'autres gènes (D et J), eux-mêmes également multiples et probablement aussi sujet à des mutations non réparées, permettent également une augmentation de la variabilité.
- 4) La chaîne légère et la chaîne lourde contribuent ensemble à la formation du site de fixation de l'antigène. La diversité de ces sites est donc aussi due à la combinaison des chaînes H et L.

**Fig. 10.** Structure d'une immunoglobuline typique.



A ces quatre mécanismes, il convient d'ajouter le fait que les phénomènes de recombinaison ne sont pas exempts d'erreurs et que ces erreurs augmentent les possibilités de diversité.

Tous ces mécanismes opèrent ensemble et expliquent ainsi la vaste gamme de possibilités différentes dont dispose un lymphocyte avant de se différencier. Statistiquement, un éventail complet de combinaisons et un nombre élevé de mutations permettent de couvrir l'ensemble des structures stériques complémentaires des antigènes potentiels.

Lors de la maturation du lymphocyte B, on observe des réarrangements chromosomiques, les gènes V et C modifiant leurs positions respectives sur le DNA génomique.

Le « choix » de la région constante peut changer chez un même lymphocyte, qui va commencer par produire les IgM et parfois même simultanément des IgD, puis ultérieurement les IgG, A ou E, avec la même spécificité d'antigène. La région V est donc la même dans ces molécules produites successivement, seule la région C change. Ce changement de région C, qui se produit généralement lors de la réponse secondaire, est appelé le *switch* (la commutation) des immunoglobulines.

## LE ROLE DES ANTICORPS

Hormis le fait que les anticorps peuvent neutraliser le pouvoir immunogène de l'antigène correspondant, ils ne peuvent eux-mêmes éliminer un élément étranger. Leur rôle dans la défense est donc subordonné à la collaboration avec d'autres cellules ou avec d'autres molécules qui elles, appartiennent à la défense non-spécifique. Les anticorps confèrent donc une spécificité à des mécanismes non-spécifiques.

Quelques exemples:

- le *complément*: perfore les membranes lipoprotéiques sur lesquelles les anticorps se sont fixés. Ceci permet l'élimination des bactéries et de certaines cellules modifiées.

Le complément (qui « complémente » l'action des anticorps), est en réalité un ensemble de molécules qui s'activent en cascade, et dont le résultat est l'élimination de l'intrus, à condition qu'il s'agisse d'une cellule, procaryote ou eucaryote. Le rôle du complément dans la défense anti-bactérienne est donc considérable.

On peut considérer que le complément remplit essentiellement trois fonctions :

- 1) il sert de médiateur d'activation du système de défense non spécifique, en particulier des macrophages;
- 2) il élimine les cellules eucaryotes ou procaryotes étrangères en provoquant leur lyse lorsqu'elles lui sont signalées par les anticorps;
- 3) il opsonise les bactéries en se fixant non-spécifiquement sur elles, sans l'intermédiaire d'anticorps dans ce cas, et permet leur élimination rapide (c'est le composant C<sub>3</sub> qui joue un rôle-clé dans ce processus). Cette troisième fonction doit être la plus ancestrale et représenter la manière primitive d'éliminer les bactéries, manière qui est encore, à l'heure actuelle, la plus rapide.

Il réalise ces fonctions au moyen de deux cascades d'activations partiellement dépendantes, que l'on appelle la voie classique et la voie alterne. La voie alterne, plus simple et vraisemblablement plus primitive, se déroule en l'absence d'anticorps, dès la rencontre avec un micro-organisme et en particulier avec ses polysaccharides complexes.

Ces cascades ne sont pas sans rappeler les cascades d'activations lors des processus de coagulation du sang et de fibrinolyse<sup>4</sup>.

- *opsonisation* : terme parfois utilisé pour des recouvrements de particules par d'autres molécules que le facteur C<sub>3</sub> du complément. C'est le cas du recouvrement par les anticorps de particules étrangères (p.ex. bactéries), ce qui les rend plus efficacement « phagocytables » par les macrophages. (Lutte anti-bactérienne).

- *cytophilie*: attachement des anticorps (dits cytophiles) par leur portion Fc aux macrophages qui deviennent ainsi «armés» d'Ig pointant leurs Fab vers l'extérieur. Les macrophages possèdent en effet des récepteurs pour les portions Fc des Ig.

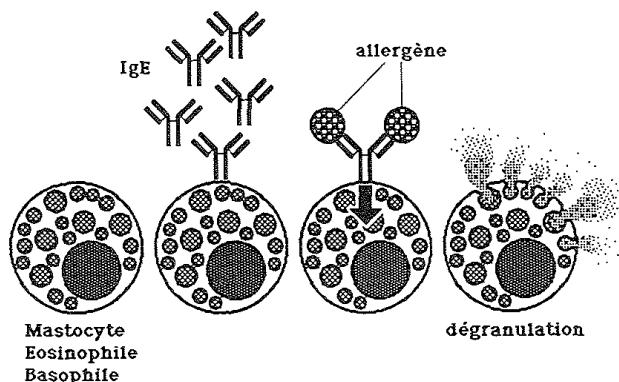
- *cytropisme* : attachement des IgE à des cellules à médiateurs (mastocytes), déclenchement de la dégranulation mastocytaire et libération d'histamine lors de la reconnaissance de l'antigène par ces IgE, appelées anticorps «homocytotropes» (Fig. 11). Le cytropisme joue un rôle important dans la lutte anti-parasitaire.

- *cytotoxicité ou cytolysse*: attachement des anticorps aux cellules présentant des antigènes Grangers (viraux ou tumoraux, p.ex.), puis reconnaissance de ces anticorps fixés par des cellules porteuses de récepteurs pour la portion Fc des Ig (monocytes ou lymphocytes K). Enfin survient le phénomène de cytolysse par ces cellules

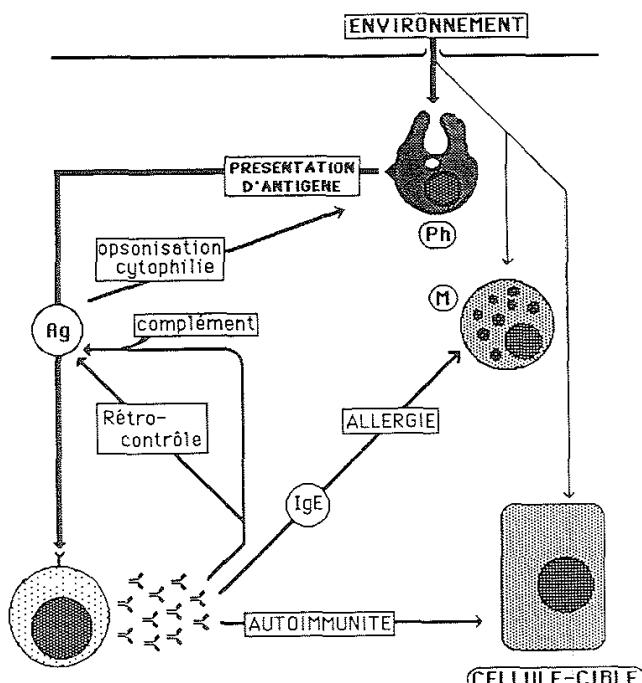
<sup>4</sup> Il existe d'ailleurs un lien entre ces différents mécanismes, car la plasmine est un élément activateur de certaines étapes des cascades du complément.

tueuses (Fig. 12).

**Fig. 11. Stimulation des cellules à médiateurs par les immunoglobulines E.**



**Fig. 12. Les rôles principaux des anticorps.**



#### LE CONTROLE DE LA PRODUCTION DES ANTICORPS

La production d'anticorps n'est pas un phénomène illimité dans le temps et dans la quantité. Il est normal que la réponse trouve un terme d'une part, et qu'elle subisse une régulation et des modulations d'amplitude, d'autre part.

Le pouvoir immunogène de l'antigène est neutralisé par l'anticorps. Le recrutement d'autres lymphocytes pouvant réagir avec l'épitope est ainsi évité, de même que l'amplification incontrôlée de la réponse. Ce processus est lent puisqu'il fait appel aux anticorps produits eux-mêmes. Cependant il permet d'éviter d'élargir trop la spécificité de la réponse, donc d'éviter de l'affaiblir, car les lymphocytes stimulés les premiers sont ceux qui présentent la plus grande affinité pour l'antigène.

Les molécules d'Ig sont catabolisées normalement dans l'organisme et disparaissent après une période plus ou moins longue selon la classe à laquelle elles appartiennent.

La régulation anti-idiotypique est encore largement hypothétique, mais est étayée par des observations expérimentales de plus en plus nombreuses confirmant les principes théoriques. Elle consisterait en une

neutralisation des sites réactionnels (paratopes) des Ig par les anticorps anti-idiotypiques formés dès la production de ces Ig.

Les anticorps anti-idiotypiques sont produits en raison du fait que l'idiotope d'un anticorps nouvellement produit est considéré par l'organisme comme un antigène nouveau, donc étranger, et suscite une réponse.

Les difficultés conceptuelles de ce mécanisme sont liées à la cascade de production d'anti-idiotypes (primaires, secondaires, etc.) qui doit se dérouler («théorie du réseau» de JERNE). Certains anti-idiotypes primaires sont dirigés contre le paratope, d'autres contre des parties différentes de la région variable (idiotope) et leur rôle est, par conséquent, différent.

#### *La regulation par les lymphocytes T.*

Des lymphocytes T augmentent (permettent même) l'activation des lymphocytes B, ce sont les lymphocytes T-*helpers*; d'autres freinent ou suppriment cette activation, ce sont les lymphocytes T-*suppressors* (voir plus loin).

### **LES LYMPHOCYTES T ET L'IMMUNITE «CELLULAIRE»**

Les lymphocytes T diffèrent des B par leurs caractéristiques antigéniques de surface, et non par leur morphologie.

Ils sont stimulés également par un antigène, mais pas si cet antigène est en suspension. Ils ne repèrent les antigènes que s'ils sont associés à des cellules de l'organisme. Des cellules spécialisées, les cellules présentatrices d'antigène (*antigen presenting cells*, ou CPA), sont seules capables d'induire la stimulation des lymphocytes T en leur présentant l'antigène correspondant à leur récepteur, et en émettant des substances activatrices (cytokines).

Les lymphocytes T portent des récepteurs à l'antigène, tous identiques sur un même lymphocyte, de structure différente de celle des immunoglobulines, mais clairement apparentés à celles-ci.

### **LES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS OU CYTOLYTIQUES (ou cytotoxiques) : Tc**

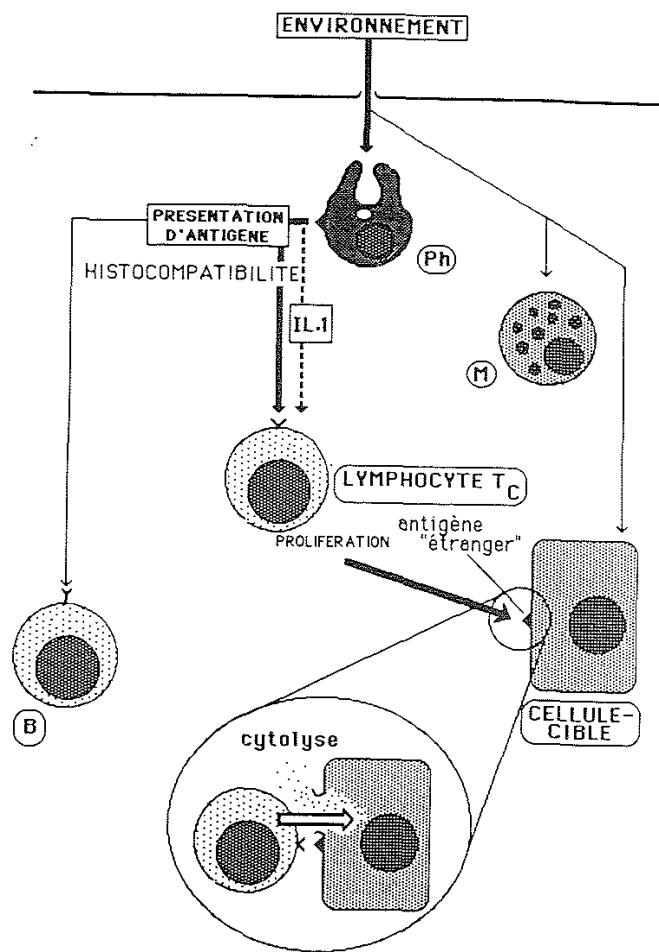
Ces lymphocytes sont responsables de l'élimination directe d'antigènes étrangers par attaque des cellules qui les portent, donc par cytolysse. On appelle traditionnellement ce phénomène: immunité cellulaire (*cell-mediated immunity*, CMI), car ce sont les cellules elles-mêmes qui sont les effecteurs, et non des molécules solubles, comme les anticorps, qui, elles, constituent l'immunité humorale.

Les lymphocytes pré-Tc (encore non-activés) reçoivent une stimulation antigénique des cellules présentatrices d'antigène (CPA: macrophages et cellules apparentées). Cette présentation de l'antigène est réalisée en conjonction avec les antigènes du « soi », de véritables « mot de passe » que constituent les antigènes d'histocompatibilité. Il faut que la CPA et le lymphocyte pré-Tc appartiennent bien au même individu<sup>5</sup> (4). Il existe donc une restriction allogénique à ce niveau (Fig. 13).

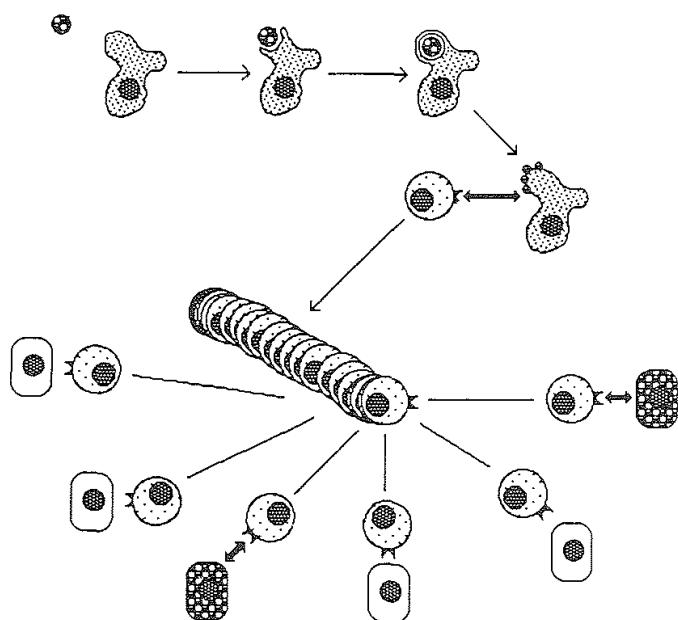
---

<sup>5</sup> Ce n'est évidemment pas là que réside la pression de sélection qui a maintenu ce système de «sécurité». Il s'agit en fait d'un mécanisme assurant la reconnaissance des cellules impliquées dans la défense. Toute présentation d'anti-gène est conditionnée à cette reconnaissance.

**Fig. 13. Function des lymphocytes T cytolytiques.**



**Fig. 14.** Phagocytose d'un virus par un phagocyte qui le digère partiellement, puis présente ses antigènes à la surface de cette même cellule, qui joue le rôle de CPA. Le lymphocyte pré-Tc reçoit cette information, prolifère, et sa descendance se répand dans l'organisme et y patrouille pour éliminer les cellules infectées qui présentent les mêmes antigènes viraux à leur surface.



La stimulation déclenche une prolifération clonale des pré-Tc en Tc activés.

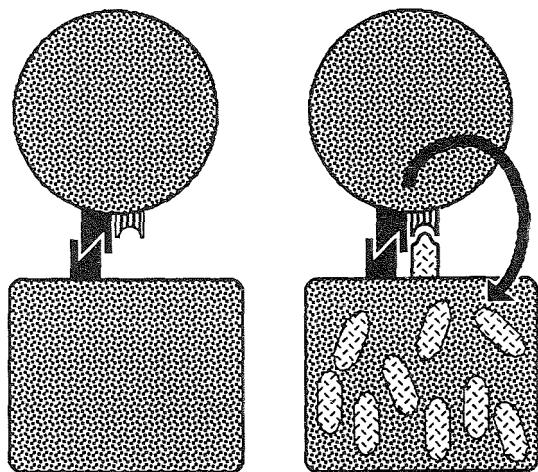
Ces derniers vont se charger de la lyse des cellules-cibles qu'ils vont reconnaître par la présence à leur surface des antigènes identiques à ceux qui les ont stimulés sur la CPA. Pour cela, ils vont émettre une lymphotoxine, parfois appelée perforine, qui va pratiquer des perforations dans la membrane de la cible d'une manière qui n'est pas encore entièrement connue, mais qui ressemble, dans son principe, à la perforation que réalise le complément dans les membranes.

Les lymphocytes Tc activés ne peuvent tuer que des cellules portant à la fois les antigènes étrangers et des antigènes du «soi».

Il y a donc, ici encore, nécessité d'une double reconnaissance.

Il existe encore une controverse sur le point de savoir si l'antigène étranger, viral ou tumoral, et l'antigène d'histocompatibilité de classe I sont reconnus par un seul récepteur ou deux récepteurs distincts du lymphocyte Tc. Ce débat trouvera bientôt sa réponse grâce à l'analyse fine du récepteur T à l'antigène.

**Fig. 15.** Dans ce schéma, deux situations sont représentées : la première, où le lymphocyte Tc activé, dans son patrouillage de l'organisme, établit un contact avec une cellule intacte, donc «normale»; la deuxième, où la cellule avec laquelle le contact est établi par l'antigène d'histocompatibilité (de classe I) exprime à sa surface un antigène viral correspondant au récepteur du lymphocyte, ce qui trahit l'infection et déclenche, par double reconnaissance, l'activité cytolytique.

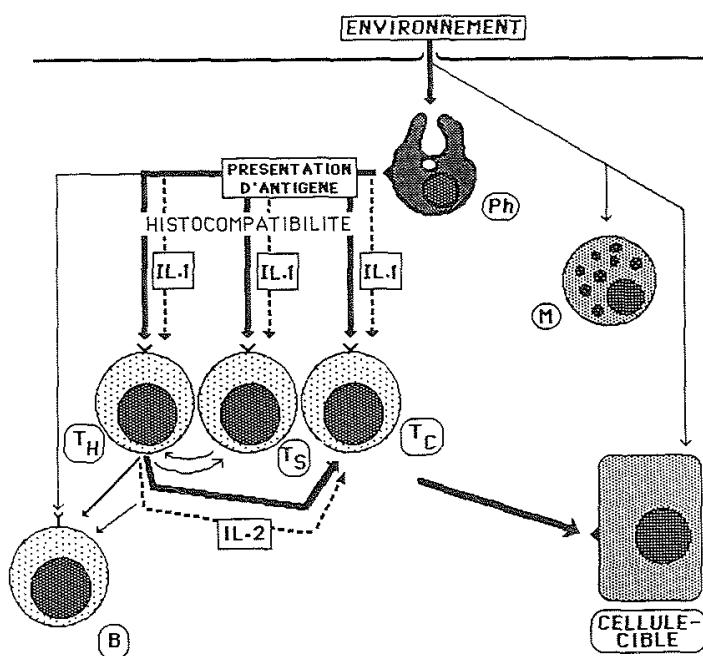


#### LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS (helper, suppressor): Th et Ts

Alors que les lymphocytes B et Tc sont des effecteurs, les lymphocytes  $T_H$  et  $T_S$  sont des régulateurs. Ils exercent leur régulation sur les effecteurs, en stimulant ( $T_H$ ) ou en inhibant ( $T_S$ ) leur activité.

On trouve également une restriction allogénique lors de la stimulation antigénique de ces lymphocytes régulateurs, mais elle est due à des antigènes d'histocompatibilité différents (classe II) de ceux que reconnaissent les Tc (classe I).

**Fig. 16. Les lymphocytes T régulateurs:  $T_H$  et  $T_S$ .**



## LA COOPERATION ENTRE LYMPHOCYTES B et T POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS

### AIDE

Les anticorps sont produits par les lymphocytes B; cependant, ceux-ci sont généralement incapables de réaliser cette production sans une information (aide) venant des lymphocytes T.

A cet égard, on distingue deux catégories d'antigènes: thymo-indépendants et thymo-dépendants. Les antigènes thymo-indépendants sont les moins fréquents. Ils sont constitués par des structures répétitives simples et régulières comme des polysaccharides, par exemple.

Un déterminant antigénique seul (haptène) est incapable de stimuler la production d'anticorps (non-immunogénique) mais bien de réagir avec les anticorps (antigénique).

Pour susciter la formation d'anticorps, il doit être porté par une structure plus grande : un porteur (*carrier*). C'est l'effet porteur. Les anticorps ainsi formés peuvent réagir avec l'haptène, même non couplé au porteur.

Le lymphocyte B reconnaît l'haptène, le lymphocyte  $T_H$  reconnaît le porteur.

Le lymphocyte  $T_H$  donne au lymphocyte B le signal de prolifération <sup>6</sup>.

### SUPPRESSION

Un certain nombre d'observations a permis de prendre conscience de l'existence de cellules qui ont un effet inhibiteur sur le fonctionnement des lymphocytes B et T effecteurs, et dont l'action est spécifique. En particulier, en cas de thymectomie (ablation du thymus) ou en présence de sérum anti-lymphocytaire (tuant les cellules T), la réponse aux antigènes T-indépendants augmente. D'autre part, les souris «nude» (congénitalement athymiques) répondent mieux aux antigènes thymo-indépendants que les souris normales.

Sur la base de ces éléments et de quelques autres, on doit conclure à l'existence d'une population de lymphocytes T suppresseurs.

<sup>6</sup> Dans une molécule complexe, chaque déterminant anti-génique joue le rôle exposé ici pour l'haptène et le reste de la molécule joue le rôle de porteur. Un déterminant peut donc jouer le rôle de porteur pour un autre et vice versa.

Ces cellules suppressives jouent certainement un rôle important dans les maladies immunodépressives, les maladies auto-immunitaires et le phénomène de tolérance spécifique.

## **LES FACTEURS SOLUBLES D'INTERACTION CELLULAIRE OU CYTOKINES**

Les molécules servant de messages intercellulaires sont très nombreuses et variées et de nouvelles sont découvertes de plus en plus fréquemment à l'heure actuelle. Un certain ordre se dégage également dans leur classification et beaucoup de dénominations s'avèrent être synonymes.

Ces médiateurs d'interaction cellulaire, autrefois affublés du terme vague de «facteurs», sont maintenant appelés cytokines. Ce sont des polypeptides, d'un poids moléculaire généralement compris entre 15 et 30 Kd, comparables à des hormones, agissant à faible distance, dans l'environnement immédiat des cellules qui les produisent (ils ont donc une action paracrine), agissant souvent sur les cellules-mêmes qui les ont produites! (ils sont donc autocrines).

Ils effectuent une régulation de diverses fonctions telles que la multiplication cellulaire (*facteurs de croissance locaux*), le mouvement cellulaire (*facteurs d'activation ou d'inhibition*), la réplication des virus dans les cellules infectées (*interférons*), l'activité cytolytique des lymphocytes et monocytes (*interleukines*), la sécrétion de protéases (*TNF*), l'expression de récepteurs sur les membranes cellulaires (*MAF*).

Les cytokines agissent en réseau, en stimulant la production d'autres cytokines par les cellules qu'elles influencent, ou la sensibilité de ces cellules à ces autres cytokines.

Ces réseaux locaux d'interaction des cytokines constituent le système fondamental de la régulation de l'inflammation et du système immunitaire en général, dans son action contre l'infection, le cancer et l'autoimmunité.

Une cytokine jouant un rôle prépondérant et central dans ces processus est l'interleukine 1 (IL-1), essentiellement produite par les macrophages et dont les effets sont très variés. La plupart de ces rôles consistent à activer la production d'autres cytokines (IL-2, IL-6, IFN). Elle joue également un véritable rôle hormonal en ceci qu'elle exerce beaucoup d'activités à distance, comme, par exemple, la stimulation de la fièvre et de l'hématopoïèse.

<i>Migration inhibitory factor</i>	MIF	2 <sup>e</sup> contact antigénique, ou ligands polyclonaux. Sécrété par lymphocytes. Non spécifique d'espèce. 34-45 Kd (cobaye), 25 Kd (humain).
<i>Macrophage activating factor ou Interféron <math>\gamma</math></i>	MAF IFN- $\gamma$	Produit par les lymphocytes T activés. 1) Stimule les macrophages. Pourrait être identique au MIF (?) et agir à d'autres concentrations. 2) Stimule l'expression d'antigènes du MHC de classe II sur les macrophages. 3) Rôle antiviral. 38-80 Kd (souris); 20-25 Kd (homme).
<i>Macrophage chemotactic factor</i>	MCF	Attire les macrophages. Différent du MIF.
<i>Leukocyte inhibitory factor</i>	LIF	Inhibe la migration des leucocytes
<i>Leukocyte chemotactic factor</i>	LCF	Attire les leucocytes par chimiotactisme.
Interleukine 1 ou <i>Lymphocyte activating factor LAF</i>	IL1	Produit par les macrophages et par une variété de cellules (T, B, c. histiocytaires, fibroblastes, c. épithéliales, etc.). Multitude d'activités, en tant que médiateur physiologique, stimulateur des lymphocytes T et B (induit la libération de lymphokines par lymphocytes T), hormone et facteur de croissance. Médiateur important de l'inflammation. Inducteur de la fièvre. Rôle antiviral indirect, par activation de l'IFN $\beta$ . 14-17 Kd (souris); $\alpha$ : 15-17, $\beta$ : 15-17 Kd (homme).
Interleukine 2 ou <i>T cell growth factor</i>	IL2 TCGF	Produit par lymphocytes T activés. Active les lymphocytes T, induit leur production de lymphokines et leur cytotoxicité (activation de «lymphokine activated killer (LAK) cells»). 25 Kd (souris); 15 Kd (homme).
Interleukine 3	IL3	Produit par les lymphocytes T activés. Stimule la croissance de nombreuses cellules-souches (précurseurs de lymphocytes ou de cellules hématopoïétiques). 28 Kd (souris).
Interleukine 4 ou <i>B cell growth factor</i> (souris)	IL4 BCGF1	Produit par les lymphocytes T activés. Facteur de croissance des lymphocytes B (souris). Facteur de croissance des lymphocytes T. 15-20 Kd (souris).
Interleukine 5	IL5 BCGF2	Produit par les lymphocytes T. Induit la différenciation des éosinophiles. Augmente la production d'IgM et d'IgA par lympho.B. 45-60 Kd (souris).
Interleukine 6	IL6 HPGF BSF-2 IFN $\beta$ <sub>2</sub>	Produit par diverses cellules (monocytes, lympho T mais surtout fibroblastes). Induit la croissance des plasmacytomes et des hybridomes (provenant donc de lymphocytes B). Induit l'expression des antigènes du MHC de classe I sur les fibroblastes. Apparemment, rôle important sur les lymphocytes T, en synergie avec IL1 (sa contamination probable des préparations d'IL1 la rendrait responsable d'une partie des activités de celle-ci?) 22-29 Kd (souris); $\pm$ 26 Kd (homme).
<i>T cell replacing factor</i>	TRF	Identique à IL-2 (homme), à MAF et IFN-7 (souris).
<i>Suppressing factors</i>	TsF	
Facteur de transfert	TF	Extrait brut de leucocytes
Lymphotoxine ou Perforine	LT	Sécrété par lymphocytes Tc activés, en présence de leur cible. Non spécifique d'antigène, de cellule, ni d'espèce. Médiateur de la cytotoxicité des Tc. 70 Kd.

## LE COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DEFINITION

Depuis longtemps<sup>7</sup>, on suspecte que le rejet de greffes relève de l'existence, sur les cellules de l'organisme, de molécules analogues à celles des groupes sanguins. Ces molécules ont ensuite été identifiées en tant qu'antigènes (c'est-à-dire par des méthodes sérologiques, donc au moyen d'anticorps) qui, lorsqu'ils étaient les mêmes chez le donneur et le receveur, permettaient de prévoir la réussite de la greffe et qui furent donc appelés antigènes d'histocompatibilité.

D'autre part, des expériences réalisées sur des lignées d'animaux congéniques ont permis de localiser la région du génome codant pour ces antigènes. Elle est située sur le chromosome 17 chez la souris et est appelée H-2. Chez l'homme, la région correspondante se trouve sur le chromosome 6 et a été appelée HLA<sup>8</sup>.

La région dite du complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex, MHC*) est donc constituée par un complexe de loci génétiques linkés, regroupant la majeure partie des gènes impliqués dans le contrôle des mécanismes immunologiques et des mécanismes de reconnaissance cellulaire en général, donc de l'histocompatibilité (il existe cependant d'autres loci dispersés ailleurs dans le génome).

## VARIETES

On reconnaît actuellement quatre classes d'antigènes d'histocompatibilité, dont les deux principales sont:

*Classe I:* présents sur la membrane cytoplasmique (ce sont, en effet, des molécules d'interaction cellulaire, donc des récepteurs membranaires) de quasi tous les types cellulaires (sauf le spermatozoïde) et ils constituent environ 1% des protéines membranaires. On compte environ 500.000 molécules de classe I par cellule.

*Classe II:* antigènes des lymphocytes T régulateurs et des cellules impliquées dans les mécanismes immunologiques. Ils sont dotés d'un polymorphisme comme les antigènes de classe I, mais ont une distribution tissulaire différente : on les trouve sur les lymphocytes B et certains lymphocytes T activés, les macrophages, les monocytes, les cellules présentatrices d'antigènes, certaines cellules épithéliales et les spermatozoïdes.

Les deux classes d'antigènes du MHC proprement dits (I et II) sont des glycoprotéines membranaires qui diffèrent entre elles par leurs propriétés sérologiques, leur localisation tissulaire et leur composition biochimique. Ces molécules manifestent un polymorphisme extrême dans l'espèce, mais sont strictement conservées chez un même individu.

## PATHOLOGIES

### HYPERSENSIBILITES

Lorsque le système immunitaire fonctionne de manière excessive et/ou inappropriée, on parle d'hypersensibilité. Il s'agit toujours d'une réponse secondaire. On connaît quatre types d'hypersensibilité, classées de I à IV par COOMBS & GELL (1963). Les trois premières relèvent de l'immunité humorale, la quatrième de l'immunité cellulaire.

#### *Hypersensibilité de type I ou hypersensibilité Immédiate*

Cette hypersensibilité consiste en la dégranulation mastocytaire suite au contact entre l'antigène (dans ce cas, un allergène) et des IgE fixées préalablement sur leur Fc-récepteur (Fcε) à la surface des mastocytes ou des basophiles (voir plus haut). Ce stimulus qui constitue la fixation de l'antigène provoque l'entrée massive d'ions calcium dans la cellule à médiateurs et cet influx de calcium entraîne l'exocytose des granules cytoplasmiques, c'est-à-dire la dégranulation. Cette libération de médiateurs tels que l'histamine ou d'autres molécules actives déclenche une réaction inflammatoire aiguë accompagnée de symptômes tels que certains eczémas et urticaires, l'asthme ou le «rhume des foins».

Les synonymes sont allergie, atopie, anaphylaxie. Leur nombre indique les difficultés rencontrées avant de réaliser que tous les phénomènes observés relèvent du même mécanisme de base.

<sup>7</sup> Depuis les travaux de K. Landsteiner, en 1931.

<sup>8</sup> Les complexes correspondants ont été identifiés dans d'autres espèces, comme le rat (RL1 : rat locus 1), le cobaye (GPLA: guinea pig leucocyte antigens), la poule (complexe B).

Les réactions allergiques sont rapides, suivant immédiatement une deuxième (ou plus) rencontre avec l'allergène. Elles sont médiées par les IgE (anciennement appelées *réagines*) qui sont produites localement, à l'endroit où l'allergène a pénétré (au niveau de la peau dans certains cas, ou au niveau de muqueuses) et vont se fixer sur les mastocytes des tissus proches. Si la production d'IgE est très abondante, elles vont passer dans le sang et se fixer sur des basophiles circulants et même sur des mastocytes d'autres tissus dans le corps.

La production d'IgE en réponse à un allergène est manifestement sous contrôle génétique, comme le démontrent les expériences chez l'animal et l'observation de la composante héréditaire importante de l'allergie.

Ce type d'hypersensibilité peut être traité par une «désensibilisation» qui consiste en injections régulières de l'allergène auquel le patient allergique est sensible, en commençant (évidemment) par des doses très faibles et en augmentant graduellement ces doses. Le mécanisme de cette désensibilisation n'est pas clairement connu. Il tient sans doute à la production, par cette méthode, d'IgG sériques qui peuvent se fixer sur l'allergène avant qu'il ne rencontre les IgE sur les cellules à médiateurs correspondantes, mais aussi au développement de lymphocytes T suppresseurs spécifiques capables de bloquer la réponse allergique.

#### *Hypersensibilité de type II ou cytotoxicité humorale*

Cette hypersensibilité est une immunité humorale, due à des anticorps dirigés contre des antigènes cellulaires de l'individu, accompagnée d'une action cytolytique des cellules capables de cytotoxicité dépendante des anticorps (cellules K, neutrophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages ou du complément. Ces anticorps sont fabriqués par l'individu lui-même (autoimmunité humorale) ou lui sont transférés par transfusion, ou encore sont transférés de la mère au foetus.

Appartiennent à l'hypersensibilité de type II : l'anémie hémolytique du nouveau-né (due au facteur Rhésus), les accidents transfusionnels (dus aux groupes sanguins), les anémies hémolytiques autoimmunes (souvent dues à des drogues et médicaments), le rejet aigu de greffe, la myasthénie grave.

#### *Hypersensibilité du type III ou hypersensibilité des complexes immuns*

Cette hypersensibilité est caractérisée par des dépôts de complexes immuns (complexes antigène-anticorps) dans les tissus. Ces complexes activent le complément et les phagocytes qui provoquent alors des lésions tissulaires.

Les complexes peuvent être présents en permanence en raison d'une infection persistante, de phénomènes d'autoimmunité ou d'une exposition constante à des facteurs environnementaux (souvent liés au contact permanent avec des animaux).

Parmi ces réactions d'hypersensibilité, on compte des alvéolites pulmonaires, des néphrites, des arthrites. La «maladie du sérum» et le phénomène d'ARTHUS font également partie de ce groupe.

La «maladie du sérum» était fréquente à l'époque précédant l'ère des antibiotiques, où on administrait des doses massives d'anticorps exogènes, de cheval par exemple, contre les bactéries comme l'agent de la diphtérie; les patients s'immunisaient contre ces anticorps exogènes. Cette maladie se rencontre encore chez les animaux d'expériences, utilisés pour la production d'anticorps, si on leur administre trop d'antigène et trop fréquemment. On peut s'attendre au même phénomène chez les patients traités de manière intensive par des anticorps monoclonaux de souris.

Le phénomène d'ARTHUS consiste en une réaction inflammatoire locale intense, apparaissant 5 à 6 heures après l'injection sous-cutanée d'un antigène. Cette réaction est due au dépôt local de complexes antigène-anticorps, qui activent le complément et d'autres composants d'une réaction inflammatoire au lieu d'injection.

#### *Hypersensibilité de type IV, ou hypersensibilité retardée (delayed type hyper sensitivity, DTH)*

Des lymphocytes T activés libèrent des lymphokines, suite à un second contact avec un antigène. Ces lymphokines induisent une réponse inflammatoire en attirant des macrophages qui libèrent eux-mêmes des médiateurs. On considère que cette hypersensibilité est «retardée» car elle ne se manifeste qu'après trois jours environ. Les autres hypersensibilités se développent dans les 12 heures.

L'hypersensibilité retardée est elle-même subdivisée en quatre sous-groupes : l'hypersensibilité de JONES-MOTE, l'hypersensibilité de contact, l'hypersensibilité tuberculinique et l'hypersensibilité granulomateuse.

Elle se manifeste dans la tuberculose, la lèpre et d'autres infections par des protozoaires, des vers ou des champignons.

La DTH relève de l'immunité cellulaire, donc de l'activité de lymphocytes T. Il semble que la DTH ne soit pas due à des lymphocytes  $T_c$ , mais à des lymphocytes  $T_H$  ou proches de ceux-ci. Dans l'attente d'une identification précise, on les appelle  $T_{DTH}$ .

## L'AUTOIMMUNITE

Le répertoire du système immunitaire est quasi illimité et inclut évidemment une réactivité contre les autoantigènes. Cependant, des mécanismes comme l'«éducation» des lymphocytes durant l'ontogenie, en particulier celle des lymphocytes T suppresseurs, empêchent cette autoréactivité de se développer.

Il existe cependant des situations pathologiques où il semble que la répression de l'auto-réactivité soit déficiente, libérant ainsi l'autoimmunité.

Ces phénomènes sont attribuables à l'immunité humorale comme à l'immunité cellulaire.

Parmi les maladies autoimmunitaires connues, on relève principalement : la thyroïdite de HASHIMOTO, le myxœdème primaire, l'anémie pernicieuse, la maladie d'ADDISON, le diabète juvénile, le syndrome de GOODPASTURE, la myasthénie grave, certains cas d'infertilité masculine et de ménopause précoce, l'anémie hémolytique autoimmune, le purpura thrombocytopénique, la cirrhose biliaire primaire, certaines formes d'hépatite, la colite ulcérente, l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux et la sclérose en plaques.

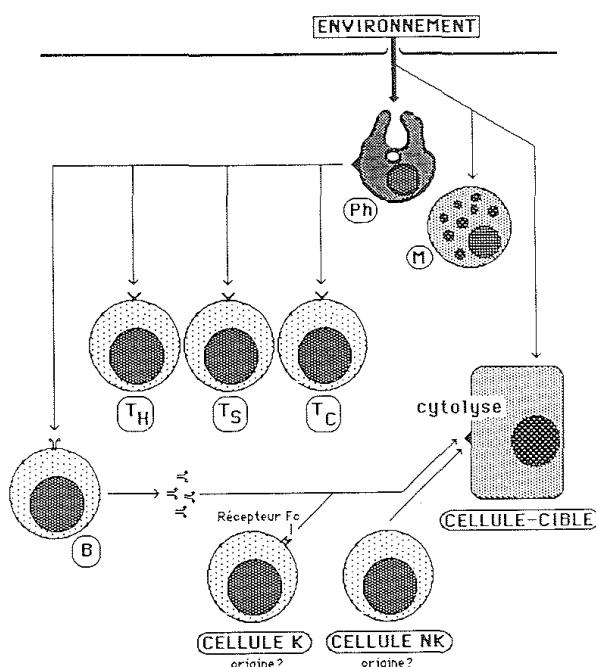
La composante familiale des maladies autoimmunitaires ne fait guère de doute et est plus certainement liée à des facteurs héréditaires qu'environnementaux. En particulier, il existe une association statistiquement significative entre maladies autoimmunitaires et groupes d'histocompatibilité HLA.

## LES MECANISMES NON SPECIFIQUES EN RELATION AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE

### LES CELLULES K (*killer*)

Des cellules à activité cytolytique possédant des récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines peuvent se fixer aux anticorps recouvrant une cellule qui présente des antigènes «anormaux» (viraux ou tumoraux) à sa surface et lyser cette cellule (Fig. 17).

**Fig. 17.** Les cellules tueuses non spécifiques.



Cette activité, appelée cytolysse cellulaire dépendant des anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*), est un mécanisme important de la défense antivirale et antitumorale. Bien que l'ADCC fasse nécessairement appel aux anticorps, donc au système immunitaire spécifique, les cellules K sont totalement non spécifiques et lysent n'importe quelle cible modifiée de n'importe quelle manière, pourvu qu'elle soit recouverte d'anticorps. On ne connaît pas de restriction allogénique à cette activité.

On a tout d'abord classé les cellules K parmi les lymphocytes et en particulier les non T. En fait, il semble que l'activité ADCC puisse être manifestée par une variété de cellules différentes: lymphocytes T, monocytes, éosinophiles.

#### LES CELLULES NK (*natural killer*)

Les cellules NK, «tueuses naturelles», sont des lymphocytes dont l'identité n'est pas clairement établie. Elles possèdent des marqueurs caractéristiques de lymphocytes, mais également d'autres types cellulaires comme les monocytes et granulocytes. Elles sont sensibles à l'activité régulatrice de cytokines comme les interleukines et l'interféron. Peut-être en existe-t-il plusieurs types. Il est vraisemblable que des cellules très différentes exercent l'activité NK, parfois en plus d'une autre activité, comme l'activité ADCC ou l'activité Tc (Fig. 17).

Les cellules NK ne peuvent donc être définies que par leur fonction et non par des critères morphologiques ni même biochimiques ou sérologiques. Elles doivent leur nom à leur propriété de cytolysse «spontanée» sans intervention d'anticorps, contrairement aux cellules K, et sans même apparemment d'exposition préalable aux antigènes, contrairement aux lymphocytes Tc. Cette cytolysse est donc distincte de l'ADCC et de la cytolysse par les lymphocytes Tc, même si elle est parfois exercée par les mêmes cellules.

Les cibles de cette activité NK sont une variété de cellules infectées par des virus et de cellules transformées.

Le mécanisme de lyse n'est pas élucidé.

#### L'INTERFÉRON

On ne peut parler des mécanismes de défense de l'organisme sans mentionner l'interféron, substance antivirale synthétisée par de très nombreuses cellules en réponse à l'infection virale elle-même.

Cette réponse n'est pas spécifique, en ce sens qu'elle est stéréotypée, toujours la même quel que soit le virus agresseur.

L'interféron (IFN) est en fait un groupe de molécules glycoprotéiques aux fonctions très diverses. On les subdivise actuellement en trois catégories :

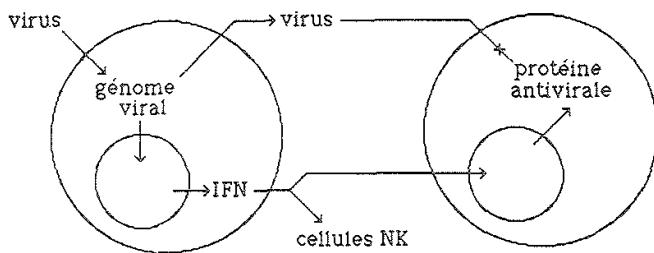
- IFN- $\alpha$ , anciennement type I leucocytaire; découvert à l'origine chez les leucocytes. Il constitue lui-même une famille de plusieurs molécules homologues.
- IFN- $\beta$ , anciennement type I fibroblastique; découvert à l'origine chez les fibroblastes. Il possède une certaine similitude avec l'IFN- $\alpha$  (45 %), et leurs gènes dérivent certainement d'un gène ancestral commun.
- IFN- $\gamma$ , anciennement type II ou «immun». Il est produit par des lymphocytes T activés (par un antigène ou un mitogène). L'IFN- $\gamma$  diffère des deux autres par ses propriétés chimiques et biologiques. Il semble jouer plus que les autres un rôle de cytokine, plutôt qu'un rôle de véritable agent antiviral.

Les deux effets principaux de l'interféron sont inhibiteurs : le blocage de la réplication virale et l'inhibition de la multiplication cellulaire<sup>9</sup>.

L'infection d'une cellule par un virus y induit la production d'interférons, ce qui se manifeste par plusieurs propriétés telles que l'activation des cellules NK, l'augmentation de l'expression des antigènes d'histocompatibilité, mais surtout le transfert aux cellules voisines d'une résistance à l'infection virale (Fig. 18).

<sup>9</sup> C'est en raison de cette propriété d'inhibition de la crois-sance cellulaire qu'on a pensé pouvoir utiliser l'interféron dans le traitement des cancers.

**Fig. 18. Mode d'action de l'interféron.**



L'interféron est une cytokine extrêmement active. Il agit à des doses 10 à 1.000 fois inférieures à celles où des hormones protéiques comme l'insuline ou le glucagon sont actives. Il n'a pas de spécificité d'action en ce qui concerne le virus, du moment que celui-ci soit sensible à l'interféron. En d'autres termes, l'interféron produit sous l'effet de l'infection par un virus sera actif vis-à-vis d'un autre virus. En outre, bien qu'il soit plus actif dans la protection des cellules de la même espèce que celle qui l'a produit, il ne manifeste pas de forte spécificité d'espèce.

La protection conférée par l'interféron est cependant plus spécifique de la cellule que du virus. En effet, l'interféron, qu'il soit humain ou de singe, protégera mieux les cellules humaines contre un virus A que contre un virus B, alors que ces deux mêmes interférons protégeront mieux le singe contre B que A.

L'effet antiviral est dû à la production, dans la cellule qui capte l'interféron au niveau d'un récepteur membranaire spécifique, de protéines qui interfèrent avec l'infection. La première de ces protéines serait une protéine-kinase qui phosphoryle le facteur d'initiation IF-2, une des molécules qui intervient dans la formation du complexe d'initiation de traduction du mRNA sur le ribosome. La phosphorylation d'IF-2 inactive cette molécule, et la traduction du mRNA viral est inhibée. Ce mRNA est alors rapidement dégradé par les ribonucléases cellulaires. La raison de l'effet sélectif sur la traduction des mRNA viraux et non cellulaires n'est pas encore comprise. La production d'interféron est mimée par du RNA bicaténaire. Le mRNA viral est monocaténaire, mais peut souvent se replier sur lui-même en une forme de double hélice, au moins partiellement. Ceci explique probablement d'une part que tous les virus n'ont pas un cycle de replication sensible à l'IFN, et d'autre part que l'action de l'IFN peut s'exercer sur le virus et pas sur la cellule.

Une deuxième protéine enzymatique est produite sous l'influence de l'IFN: la 2-5A synthétase. Celle-ci catalyse la polymérisation de nucléotides d'adénine en une longue chaîne poly-A, mais où les nucléotides sont joints par une liaison 2'-5' et qu'on appelle acide 2,5 oligo-adénylique ou 2-5A. Celui-ci active les ribonucléases cellulaires, accélérant la dégradation des mRNA et, par conséquent, l'élimination des mRNA viraux.

Enfin, une troisième protéine est produite, qui joue un rôle régulateur sur la production même d'interféron et finit par s'arrêter complètement.

Le mécanisme par lequel l'interféron (surtout l'IFN $\gamma$ ) bloque la croissance cellulaire n'est pas connu. Il se pourrait que ce soit par la voie du 2-5A, ou par une voie tout à fait différente, encore à découvrir.

## APPENDICE : METHODES DE DETECTION DES REACTIONS Ag-Ac

### PRECIPITATION

#### 1. EN MILIEU LIQUIDE

Lorsqu'on superpose deux couches liquides, l'une contenant l'antigène et l'autre l'anticorps, on observe une précipitation à l'interface. Cette méthode est très peu sensible, et peu pratique.

#### 2. EN MILIEU SEMI-SOLIDE

La précipitation peut être mieux contrôlée et observée en gélose semi-solide d'agar ou d'agarose. La gélose, chauffée et à l'état liquide, est déposée sur une lame ou dans une boîte, où elle se solidifie en refroidissant. Des trous sont pratiqués dans le gel et les solutions d'antigène et d'anticorps à étudier y sont déposées et vont diffuser dans la gélose, de façon radiale.

## 2. a. Simple diffusion

Dans cette variante, un des composants de la réaction (antigène ou anticorps) est mélangé d'embrée à la gélose lorsque celle-ci est encore liquide, et seul l'autre composant est déposé dans les puits. Il diffusera alors directement dans la gélose contenant l'autre partenaire de la réaction. C'est la simple diffusion radiale de MANCINI. Elle permet une mesure quantitative pour autant qu'elle soit accompagnée d'une courbe étalon réalisée avec un composant de concentration connue.

## 2.b. Double diffusion

Dans ce cas, la gélose ne contient pas de composant de la réaction. Les réactifs diffusent chacun à la rencontre l'un de l'autre et précipitent lorsqu'ils sont en concentration adéquate pour former des complexes précipitants. C'est la double diffusion radiale d'OUCHTERLONY.

La technique d'OUCHTERLONY n'est pas quantitative, mais elle permet la détection d'une identité complète ou partielle, ou de la non identité entre épitopes d'antigènes. Elle peut donc être utilisée pour déterminer les relations entre deux antigènes et un même anticorps.

## 2.c. Immunoélectrophorèse (IEP)

Certains mélanges d'antigènes peuvent être trop complexes pour être analysés convenablement par immunodiffusion et immunoprecipitation. Ces préparations sont donc tout d'abord soumises à une séparation par électrophorèse sur base de leur charge. Ensuite, l'antisérum est disposé dans une gouttière parallèle à l'axe de migration électrophorétique. Les antigènes ainsi séparés vont migrer dans la gélose à la rencontre de l'antisérum, qui diffuse, lui, depuis la gouttière. C'est l'immuno-électrophorèse standard de GRABAR et WILLIAMS.

Il existe des variantes à cette technique, telles que la contre-immunoélectrophorèse de LANG et HAAN, qui consiste à soumettre à un champ électrophorétique l'antigène et l'anticorps, en se basant sur la différence de charge entre antigènes et anticorps à un pH judicieusement choisi (à pH 8, la plupart des antigènes sont électronégatifs alors que les IgG sont positives). Antigène et anticorps vont alors à la rencontre l'un de l'autre et la sensibilité de la méthode est d'autant plus grande qu'il n'y a guère de pertes par diffusion.

L'antigène peut également être soumis au champ électrique dans une gélose contenant l'anticorps. Il s'agit alors de l'immunoélectrophorèse en «fusée» (*rocket IEP*) de LAURELL, qui doit son nom à la forme du précipité en traînée dans la gélose.

## AGGLUTINATION

Ces méthodes, basées sur le pouvoir qu'ont généralement les anticorps d'agglutiner les particules portant les antigènes correspondants, sont assez peu précises, mais très sensibles.

- active directe : l'antigène appartient à la particule, et les anticorps effectuent le pontage.
- active indirecte<sup>10</sup> : l'antigène appartient à la particule, qui est recouverte des anticorps spécifiques et le pontage est réalisé par des anticorps secondaires (anti-anticorps).
- passive directe : l'antigène est artificiellement adsorbé sur la particule, le pontage est effectué par les anticorps spécifiques.
- passive indirecte : l'antigène est artificiellement absorbé sur la particule, qui est tout d'abord recouverte des anticorps spécifiques et le pontage est réalisé par des anticorps secondaires (anti-anticorps).

## COMPLEMENT

## TESTS DIRECTS

Les antigènes sont portés par des bactéries (bactériolyse), des globules rouges (hémolyse) ou des cellules nucléées (cytolysse).

<sup>10</sup> Exemple : méthode de Coombs pour la détection des autoanticorps dans l'anémie hémolytique autoimmune.

Le dosage est réalisé par la mesure de:

- changements morphologiques (observation microscopique de la lyse);
- changement des propriétés de transmission lumineuse (modification des propriétés de dispersion lumineuse (*light scattering*) des suspensions cellulaires après lyse;
- la libération d'hémoglobine.

#### TESTS INDIRECTS

La fixation du complément sur le complexe antigène-anticorps dont la formation doit être détectée est mesurée par un système révélateur qui est, lui-même, un complexe antigène-anticorps, dont l'antigène est cellulaire (globules rouges de mouton). L'absence de lyse de ce système révélateur indique que le complément a été fixé par un autre complexe antigène-anticorps.

#### NEUTRALISATION DE PROPRIETES BIOLOGIQUES

La neutralisation d'activités enzymatiques, de toxines, de pouvoir infectieux de virus ou de bactériophages, etc., peut être révélatrice de la fixation d'un anticorps sur un antigène doté de ces activités. Toutefois, la neutralisation d'une activité par un anticorps ne signifie pas que cet épitope est précisément responsable de cette activité. Il peut en effet s'agir de sites proches, mais non identiques.

#### ANTICORPS MARQUES

Les anticorps peuvent être couplés à un marqueur visible ou révélateur par:

- une émission lumineuse visible : immunofluo-rescence (IF).
- une activité enzymatique mesurable : *enzymo-immunoassay* (EIA).
- une opacité aux électrons : immunomarquage pour la microscopie électronique.
- de la radioactivité : *radio-immunoassay*<sup>11</sup> (RIA).

L'utilisation de ces techniques pour la détection et la localisation d'antigènes dans les tissus constitue le domaine de l'immuno-histochimie; lorsque cette détection est réalisée à l'échelle des cellules, on parle d'immuno-cytochimie.

##### 1. IMMUNOFLUORESCENCE

Quand un photon heurte une molécule, l'énergie est absorbée par certains électrons, et la molécule est ainsi amenée à un état excité. Le retour à l'état normal (non excité) s'accompagne d'une libération d'énergie. Cette énergie est libérée sous forme de chaleur ou de lumière, selon la molécule. La lumière émise par un fluorochrome est fluorescente. Elle est d'une énergie moindre que la lumière incidente.

Après avoir traité la préparation à observer au microscope optique avec des anticorps couplés à un fluorochrome, on l'illuminera donc avec une source de lumière ultraviolette, invisible, et l'émission par le fluorochrome sera située dans le spectre visible. Seuls les fluorochromes seront visibles, révélant donc les anticorps qui y sont couplés.

Les principaux fluorochromes utilisés sont la fluorescéine (émettant dans le vert), la rhodamine (émettant dans le rouge), le rouge Texas (émettant également dans le rouge), un dérivé de la coumarine (émettant dans le bleu), etc. Ces différents marqueurs permettent d'effectuer, sur une même préparation, plusieurs marquages simultanés, révélant ainsi les localisations relatives d'antigènes différents.

<sup>11</sup> Le RIA fonctionne le plus généralement par antigène marqué (voir plus loin).

L'observation se fait au microscope à fluorescence (filtres d'excitation sur le faisceau incident, filtres barrière entre la préparation et l'oculaire, pour définir la bande passante) en transillumination ou épi-illumination.

Immunofluorescence directe: l'anticorps est couplé au fluorochrome.

Immunofluorescence indirecte: l'anticorps n'est pas couplé, c'est un anticorps secondaire (anti-anticorps) qui porte le marqueur.

## 2. ENZYME IMMUNOASSAY

Dans ce cas, les principes sont identiques, mais le couplage est réalisé avec des enzymes au lieu de fluorochromes. Les enzymes sont choisis de telle manière que les substrats correspondants, après avoir réagi, fournissent un produit identifiable, par colorimétrie ou par d'autres propriétés.

Les enzymes les plus utilisés sont la peroxydase du raifort (*horseradish peroxidase, HRP*), la phosphatase alcaline (*AP*), la  $\beta$ -galactosidase, l'uréase, etc.

Le couplage consiste alors en une conjugaison protéine-protéine et peut être réalisé par diverses méthodes, utilisant la glutaraldéhyde ou des *linkers* bifonctionnels ou hétéro-bifonctionnels, ou encore, si les protéines possèdent des groupements glucidiques, le periodate.

*Révélation par le substrat*

*Peroxydase*: le substrat est le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée):



en présence de donneurs d'électrons comme par exemple :

- la diaminobenzidine (DAB): son oxydation provoque sa polymérisation en une substance brune amorphe, insoluble, opaque aux électrons en présence de  $\text{OsO}_4$ . Ce système est applicable à la microscopie optique ou électronique, et à la révélation sur membrane (voir plus loin).

- le 2,2'-azino-di-[3-éthyle benzothiazoline-sul-fonate(6)] (ABTS) et l'orthophénylène diamine (OPD): ces réactifs donnent une coloration mesurable et présentent donc un intérêt pour les dosages colorimétriques quantitatifs (cf. ELISA).

*Phosphatase*: le substrat est une molécule contenant un groupement phosphate qui est enlevé par l'enzyme, comme le paranitrophénol phosphate (PNP), dont la coloration change sous l'action de la phosphatase. Des méthodes d'amplification, basées sur l'utilisation d'ATP, permettent actuellement d'atteindre une sensibilité extrêmement élevée.

*Uréase*: le substrat est l'urée. La réaction produit du  $\text{NH}_3$ , donc elle augmente le pH, ce qui est mis en évidence par l'usage d'un indicateur comme le rouge de bromocrésol.

*Méthode de la peroxydase-anti-peroxydase (PAP)*

Afin d'amplifier le signal de la révélation de la peroxydase lors de l'observation sur coupes, et de réduire le bruit de fond, il est possible d'utiliser le système de la peroxydase-anti-peroxydase :

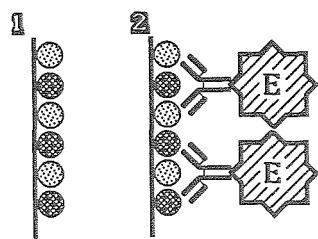
1. anticorps (d'une espèce X) anti-antigène;
2. anticorps (d'une espèce Y) anti-Ig de l'espèce X : anticorps de pontage, ajouté en excès afin de ne pas saturer ses paratopes;
3. anticorps (de l'espèce X) anti-peroxydase + peroxydase (complexe PAP).

L'anticorps 2 va se fixer à l'anticorps 1 et à l'anticorps 3, qui sont tous deux de la même espèce X, et former un pont entre ces deux anticorps.

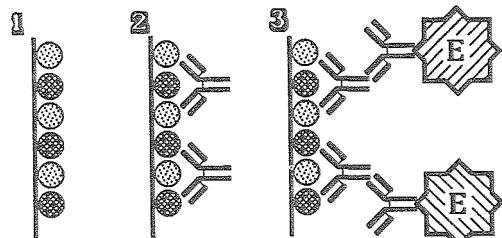
ELISA. (*Enzyme-linked immunosorbent Assay*)

- direct:

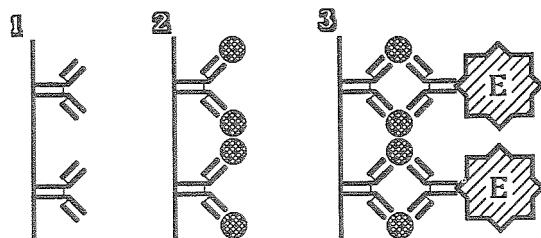
1. l'antigène est fixé sur un support solide (plastic: ELISA classique; filtre de nitrocellulose: «*dot blotting*», etc.);
2. un anticorps, couplé à un enzyme, et spécifique de l'antigène, est ajouté ensuite;
3. le substrat de l'enzyme est introduit dans le système et provoque la réaction colorée;
4. on procède à une lecture colorimétrique. support/Ag/Ac\*/substrat (\*: enzyme).



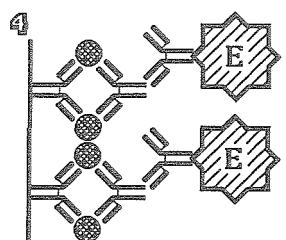
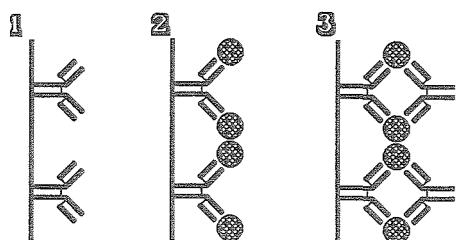
- Indirect: support/Ag/Ac1/Ac2\*/substrat.



- en sandwich: support/Ac1/Ag/Ac2\*/substrat.



- en double sandwich: support/Ac1/Ag/Ac2/Ac3\*/substrat.



Les avantages de la technique d'ELISA résident en sa rapidité, la possibilité d'utiliser un conjugué anti-Ig «passe-partout» (il n'est pas nécessaire de disposer d'un conjugué direct pour chaque test) et la possibilité de procéder à des mesures tant qualitatives que quantitatives.

### 3. IMMUNOFERRITINE

La ferritine est une protéine contenant 20% de fer (sous forme d'hydroxyphosphate ferrique). Elle est opaque aux électrons, donc utilisable en microscopie électronique après couplage aux anticorps.

Cette méthode peut être directe ou indirecte, comme l'immunofluorescence.

#### 4. *OR COLLOIDAL (immunogold)*

Des particules d'or colloïdal sont couplées aux anticorps. L'or colloïdal ayant une coloration rougeâtre, est donc visible directement ou en microscopie optique. En outre, il est opaque aux électrons et peut être utilisé en microscopie électronique, au même titre que la ferritine.

Il est possible de réaliser des doublemarquages avec des particules d'or de dimensions différentes couplées à des anticorps différents.

#### 5. *RADIOIMMUNOASSAY (RIA)*

Dans ce cas, le marqueur est un isotope radioactif. Le RIA le plus répandu est basé sur l'utilisation d'un antigène marqué, avec lequel l'antigène à détecter entre en compétition pour l'anticorps spécifique. Le principe est donc celui de l'inhibition compétitive entre antigène marqué et antigène froid. Cependant, le calcul n'est possible que si l'antigène détecté est bien identique à l'antigène d'étalonnage (même valence et même affinité).

La séparation des complexes antigène-anticorps est généralement réalisée par un anticorps anti-Ig précipitant. D'autres méthodes sont cependant possibles (chromatographie, diffusion en gel, électrophorèse, attachement des anticorps à un support solide).

### METHODES HYBRIDES

#### 1. *UTILISATION DE LA PROTEINE A DE STAPHYLOCOQUE*

La protéine A de *Staphylococcus* a la propriété de se fixer sur la portion Fc des IgG, en laissant intacte leur région Fab, donc leur fonction de liaison à l'antigène. Cette protéine peut donc être utilisée, *in situ*, sur les bactéries ou isolée ou encore couplée à divers supports (billes de Sepharose, etc.) pour détecter, séparer ou purifier les Ig.

On peut donc remplacer les anticorps secondaires par la protéine A, couplée à des marqueurs (fluorescéine, rhodamine, peroxydase, iodé radioactif, etc.), à condition de se souvenir qu'elle reconnaît indistinctement les Ig de toutes les espèces animales (elles sont donc beaucoup moins spécifiques que les anticorps anti-Ig) et qu'elles n'attachent pas toutes les sous-classes d'IgG dans les mêmes conditions.

Cette dernière réserve est d'ailleurs mise à profit pour séparer les sous-classes d'IgG par chromatographie sur un support de protéine A-Sepharose en gradient de pH.

#### 2. *IMMUN-AUTORADIOGRAPHIE*

Des anticorps marqués par un isotope radioactif (p. ex. I<sup>131</sup>) peuvent être repérés par autoradiographie de coupes de tissus, en déposant une emulsion photographique sur la lame portant les coupes, pour la microscopie photonique, ou sur la grille de microscopie électronique. Cette méthode permet de localiser les antigènes recherchés dans des tissus.

#### 3. *RADIOIMMUNOPRECIPITATION (RIPA)*

Cette méthode s'applique, par exemple, dans le cas de l'étude des virus ne bloquant pas les synthèses cellulaires ou difficilement séparables des cellules. D'une manière plus générale, elle s'applique à la détection spécifique d'antigènes dans un ensemble d'antigènes cellulaires.

Elle consiste en un marquage radioactif des protéines totales de l'échantillon (par exemple, par incorporation de méthionine-<sup>35</sup>S par *pulse-chase*), puis au traitement par les anticorps. Ensuite, les complexes antigène-anticorps sont précipités par la protéine A de staphylocoque. Le précipité est resuspendu, préparé pour une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE), puis soumis à cette électrophorèse. Enfin, le gel est analysé par autoradiographie.

#### 4. IMMUNOBLOTTING

L'échantillon à analyser est déposé sur un filtre de nitrocellulose auquel il s'adsorbe. Le filtre est ensuite traité par les anticorps marqués (ou par des anticorps non marqués, révélés ensuite par des anticorps anti-Ig marqués ou de la protéine A marquée).

Cette technique correspond donc à l'ELISA (= *solid phase* EIA) ou au *solid phase* RIA.

#### 5. IMMUNO-ELECTROTRANSFERT

Cette méthode, également appelée *Western blotting*, s'applique aux mêmes cas que la radio-immunoprécipitation, tout en permettant d'éviter l'usage d'isotopes radioactifs.

Elle consiste en un transfert sur une membrane de nitrocellulose, grâce à un champ électrique, de polypeptides préalablement séparés par SDS-PAGE et de les révéler ensuite comme décrit pour l'immunoblotting. Elle permet l'identification immunologique de peptides séparés et dont le poids moléculaire est évalué.

L'immuno-électrotransfert n'a de sens que si les antigènes à détecter ne sont pas endommagés par le traitement dénaturant de l'électrophorèse.

### SENSIBILITE RELATIVE DES DIVERSES METHODES

METHODE		QUANTITE D'ANTIGENE DETECTE
Immunoprécipitation	Dosage de protéines	6-25 µg/ml
Immunodiffusion	ring test	20-30 µg/ml
	néphéломétrie	0,5 µg/ml
Immunoélectrophorèse	en tube	10-110 µg/ml
	radiale	10 µg/ml
Agglutination	standard	100 µg/ml
	croisée (Laurell)	0,02 µg/ml
Fixation du complément	directe	0,1-120 µg/ml
	indirecte	0,6-1 µg/ml
	passive	0,03 µg/ml
Polarisation de fluorescence		0,1-1 µg/ml
Quenching de fluorescence		3-10 µg/ml
RIA, EIA, Immunoblotting		< 40 µg/ml
Neutralisation (virus, phages)		0,001
		1 molécule (théorique)

### REFERENCES

Cette revue présente des aspects tellement généraux de l'Immunologie qu'il n'est pas possible de mentionner ici toutes les références des articles originaux qui contiennent les données sur lesquelles cet exposé de synthèse est basé. Toutefois elle est nécessairement résumée et quelquefois fort elliptique.

Le lecteur intéressé par de plus amples informations pourra les trouver dans divers ouvrages de référence:

B. ALBERTS et al.: *Molecular Biology of the Cell*. Garland. J.F. BACH: *Immunologie*. Flammarion. J.F. BACH et P. LESAVRE: *Immunologie*. Flammarion Médecine-Sciences.

J.A. BELLANTI: *Immunology: Basic Processes*. Saunders. J. KLEIN: *Immunology, the Science of Self-nonself Discrimination*. Wiley.

I. ROITT et al. : *Immunology*. Gower. I. ROITT et al. : *Immunologie fondamentale et appliquée*. Medsi.