

## 1. Signalisation T : La transmission des signaux d'activation par TcR, le récepteur spécifique de l'antigène

a) **Le complexe TcR/CD3** : Le récepteur de l'antigène des lymphocytes T est un complexe multimoléculaire, le complexe TcR/CD3, composé de six protéines membranaires, avec chacune un seul domaine transmembranaire et une partie Nterminale extracellulaire. Le TcR proprement dit a pour fonction de reconnaître et de fixer spécifiquement les peptides antigéniques présentés par le CMH. Il ne transmet aucun signal directement. CD3, associé de façon non covalente au TcR, est responsable de la transmission des signaux externes vers l'intérieur de la cellule.

### b) Événements précoces de l'activation

La reconnaissance du peptide antigénique fixé au CMH par le TcR/CD3 est suivie au niveau intracellulaire par un ensemble d'événements biochimiques précoces qui aboutissent dans un premier temps à l'activation d'une enzyme ubiquitaire, la PLC, une phospholipase C réglée par phosphorylation sur tyrosine. Elle conduit à la voie de transduction par les phosphoinositides utilisée par plus de 25 récepteurs de surface de différents types cellulaires. Ces événements précoces (1 à 60 secondes) consistent en fait en l'activation par phosphorylation sur tyrosine de plusieurs protéines tyrosine kinases (PTK). Ces enzymes catalysent l'addition d'un groupement phosphate sur la fonction phénol de résidus tyrosine.

Avant de détailler la biochimie des signaux de transduction, nous allons nous attarder sur un point fondamental du mécanisme de transmission des signaux, l'importance des associations entre les différentes protéines impliquées. Ces interactions protéiques sont non covalentes et nous pouvons en définir plusieurs types :

- **Les associations qui interviennent entre protéines de surface de cellules différentes** : il s'agit des interactions typiques récepteur-ligand. Les molécules que nous avons classées en tant que « récepteurs d'adhérence » y participent, comme CD2, CD5, CD 11a / CD 18, qui augmentent l'adhérence intercellulaire entre la cellule T et la CPA, et ainsi augmentent ou prolongent la réponse de la cellule T.

- **Les associations qui existent entre les molécules de surface d'une même cellule**. Elles sont à l'origine de complexes multimoléculaires de surface qui constitueraient un langage cellulaire dynamique permettant à la cellule de communiquer de façon adaptée avec son environnement.



10  
2

• Enfin, les associations qui s'établissent entre des protéines de surface transmembranaires et des protéines intracellulaires. Le plus souvent, les protéines de surface mises en jeu sont incapables de transduire des signaux par elles-mêmes, et c'est leur association à une protéine intracellulaire transductrice qui leur permet de mettre en relation l'extérieur et l'intérieur de la cellule (exemple des PTK).

La stimulation du TcR induit alors la phosphorylation sur tyrosine d'autres protéines membranaires (CD3, CD5, CD6), et cytoplasmiques (PLC), impliquées dans la suite des événements de transduction.

### c) Événements plus tardifs : la voie des phosphoinositides

La cascade décrite de phosphorylations sur tyrosine aboutit à l'activation de la PLC. Elle déclenche les mêmes effets que dans les autres cellules où elle est mise en jeu, l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) qui produit comme seconds messagers le phosphatidylinositol 2,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAC). Le DAC provoque l'activation de la protéine kinase C (PKC) et l'IP<sub>3</sub> induit une augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracytoplasmique libre qui est responsable de l'activation d'une enzyme clé, la calcineurine.

### d) La connexion Ca<sup>2+</sup> / calcineurine

Cette connexion permet de faire la liaison entre les événements de transduction qui se situent au niveau de la membrane plasmique et les événements de transcription dans le noyau. La calcineurine est une sérine phosphatase dépendante du calcium/ calmoduline (CaM : Calcium modulated protéine, est une calci-protéine ubiquitaire, capable de s'associer aux ions calcium présents dans le milieu cellulaire). Par son activité enzymatique, la calcineurine agit sur l'activité d'un facteur de transcription spécifique du gène de l'IL2, NF-AT. Le NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells, facteur nucléaire des LT activés) est un ensemble de protéines de la famille des facteurs de transcription impliqué dans la réponse immunitaire. Le NF-AT est constitué d'une sous-unité cytoplasmique, cible de la calcineurine, et d'une sous-unité nucléaire. La sous-unité cytoplasmique est transloquée dans le noyau après activation par la calcineurine, et, en association avec la sous-unité nucléaire activée, participe à l'initiation de la transcription de gènes spécifiques de l'activation du lymphocyte T, comme le gène de l'IL2 (Notons que d'autres facteurs de transcription sont spécifiques du gène de l'IL2 et interviennent aussi lors de l'activation cellulaire).

### e) Intervention des protéines G

La sous-unité nucléaire de NF-AT semble être activée par une voie impliquant la protéine G (p21). L'activation de la protéine G (p21) par le TcR résulte à la fois de mécanismes dépendants et indépendants de PKC. La protéine G (p21) activée permet la régulation d'une cascade de kinases semblable à celle observée dans le cas des récepteurs des cytokines, qui aboutit à l'induction de la sous-unité nucléaire de NF-AT. Le complexe de transcription NF-AT, une fois activé, participe alors à la transcription du gène codant pour l'IL2.

### h) Principales molécules de régulation du signal

- **La molécule CD2** : CD2 est une molécule exprimée par les lymphocytes T, les thymocytes et les cellules NK natural killer. Trois ligands ont été mis en évidence : CD58 (principalement), CD 59 et CD48. L'interaction de CD2 avec son ligand induit une augmentation de l'adhérence cellule T et la CPA <sup>et l'activation</sup> et ainsi augmentent ou prolongent la réponse de la cellule T.

#### - Rôle de CD2 dans l'activation de la cellule T

La stimulation de CD2 provoque une augmentation du calcium intracytoplasmique et de l'hydrolyse des phosphoinositides. Elle entraîne également la phosphorylation sur tyrosine de nombreuses protéines, CD3, la PTK (protéines tyrosine kinases) et la PLC (phospholipase C). En outre, la stimulation de CD2 induit l'activation de la protéine G (p21).

- **La molécule CD28** : molécule accessoire majeure CD28 est une glycoprotéine dimère de 44 kDa. Elle est exprimée par une majorité de lymphocytes T (95% des CD4+ et 50 % des CD8+). Ses ligands sur les CPA sont CD80 et CD86. Le signal transmis après interaction de CD28 avec ses ligands serait indispensable à l'activation efficace du lymphocyte T. Le CD28 agit via la IP3-kinase (phosphoinositol-3 kinase), à la suite de la stimulation antigénique et de l'interaction avec ses ligands.

- **La molécule CD45** : CD45 (T200 ou LCA, leukocyte common antigen) est une glycoprotéine présente de façon très abondante sur toutes les cellules nucléées hématopoïétiques. Le CD45 participe à des complexes moléculaires fonctionnels. Le domaine intraplasmique de CD45 possède une activité phosphotyrosine phosphatase (possède une activité tyrosine phosphatase contrôlant l'activité des PTK) qui est nécessaire à la transduction des signaux par les récepteurs des lymphocytes T et B.

## 2. Signalisation B : La transmission des signaux d'activation par BcR

Le premier signal BCR aura cependant été indispensable, bien sûr pour engager la spécificité de la réponse mais aussi pour transformer le lymphocyte B en une véritable cellule présentatrice de l'Ag (CPA), en particulier par une surrégulation de l'expression des molécules CD80 et CD86 interagissant avec la molécule CD28 du lymphocyte T. Il s'agit là d'un des signaux de costimulation les plus précoces et essentiels à la coopération T-B et donc à l'induction d'une réponse humorale primaire.

La costimulation B implique des interactions essentielles T-B. De véritables synapses (jonctions) immunologiques s'y forment, assurant la spécificité de la réponse antigénique et mettant en jeu des interactions moléculaires de costimulation, d'adhésion et de suppression/régulation, permettant d'activer puis moduler la réponse B, tout en initiant la mise en place de sa mémoire.

### a) Signalisation via le BCR

L'activation du couple BCR/CD19 va induire la production de facteurs de transcription qui modulent l'expression des gènes du LB.

L'activation du BCR suit des mécanismes moléculaires très proches de ceux du TCR. La stimulation du lymphocyte B via le BCR, comme celle via le TCR, induit de nombreux événements précoces de phosphorylation qui font intervenir plusieurs types de kinases. L'association à ces kinases implique notamment les motifs présents dans les régions cytoplasmiques de  $\alpha$  et  $\beta$ . chacune des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  semble responsable de la mise en jeu de signaux précoces différents et complémentaires. La chaîne  $\alpha$  semble jouer un rôle prédominant dans la signalisation précoce via sa phosphorylation par les phosphotyrosine kinases (PTK) alors que la chaîne  $\beta$  serait plus fortement phosphorylée sur des résidus sérine et thréonine et interagit, sous sa forme phosphorylée, avec une phosphatidylinositol-3kinase (IP3K). Ces phosphorylations touchent plusieurs protéines et sont suivies par l'activation d'une phospholipase C, PLC qui règle la formation d'inositol-phosphates et de diacylglycérol (DAC), qui à leur tour entraînent, respectivement, une augmentation du calcium cytosolique et l'activation de PKC comme cela a été décrit pour le TCR. L'ensemble de ces processus conduit à la phosphorylation et à l'activation de différents facteurs de transcription réglant potentiellement l'expression de molécules

de surface importantes pour la présentation de l'antigène aux lymphocytes T ou pour les interactions TB.

### **b) Les molécules régulatrices de l'activation du BCR**

- **La molécule CD19** : est une des molécules du lymphocyte B exprimée le plus précocement dans la différenciation B et dont l'expression est maintenue jusqu'au stade préplasmocytaire. L'expression de CD19 est en effet retrouvée sur des progéniteurs très précoces (CD 19 sont détectables avant tous les autres marqueurs spécifiques des cellules B). c'est l'une des molécules impliquées dans les interactions cellulaires. De nombreux effets fonctionnels suggèrent une association au BCR :

- les IgM de surface (IgM) et CD19 sont coexprimés à la surface des lymphocytes B mûrs.
- l'engagement de la molécule CD19 induit un accroissement des substrats cytoplasmiques phosphorylés sur des tyrosines, une mobilisation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, et une production d'IP3 et diminue les quantités d'antigène nécessaires à l'activation des lymphocytes B.

Le CD19 est un marqueur membranaire du lymphocyte B, permettant notamment de quantifier les lymphocytes B dans le sang. CD19 forme un corécepteur avec CD21 et CD81 pour délivrer un signal d'activation aux lymphocytes B.

- **Les CD80 (appelée aussi B7-1) et CD86 (B7-2)** sont des molécules de costimulation (ou second signal) qui ne sont pas restreints à la lignée B. Ils sont également trouvés sur les cellules présentatrices d'antigènes telles que les monocytes et les cellules dendritiques. L'interaction de CD80/CD86 avec leur ligand sur la cellule T (CD28 et CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated protein-4) joue un rôle très important pour l'activation complète ou l'arrêt fonctionnel des cellules T. L'interaction de CD28, molécule exprimée sur toutes les cellules T, avec CD80/CD86 donne un signal activateur à la cellule T (TCR-CMH/peptide = signal 1 ; CD28-CD80/CD86 = signal 2).

**CD40L-CD40** CD40 est exprimé par le lymphocyte B et interagit avec son ligand spécifique, CD40L, fortement exprimé par les T CD4. Cette interaction joue un rôle majeur, tant son absence empêche le développement des plasmocytes. L'interaction de CD40 avec son ligand fournit un signal de survie aux lymphocytes B et induit la commutation de classes d'immunoglobulines (changement d'isotype des Ig). Après liaison de CD40, les cellules dendritiques produisent de grandes quantités d'IL-12 et entrent en maturation finale (les IL-12 dirigent la réponse des cellules vers type Th1).

## Acquisition de la mémoire : spécificité de l'immunité acquise ; Vaccination

L'immunité adaptative est caractérisée par une réponse avec un haut degré de spécificité et une réponse dite "mémoire". Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative nécessite un délai avant de se mettre en place. De plus, la présence d'une mémoire immunologique, définie par la spécificité à un antigène ou à une gamme d'antigènes sur le long terme. Une mémoire immunologique permet une destruction plus efficace et plus rapide lors d'un second contact avec le même antigène. Cette mémoire immunitaire permettra l'acquisition progressive d'une protection s'opposant à la réplication des antigènes les plus fréquemment représentés dans l'environnement de chaque individu. Le phénomène de mémoire immunologique est fondamental pour les espèces, mais ces mécanismes cellulaires ou moléculaires ne sont pas complètement compris.

Typiquement, la reconnaissance d'un pathogène conduit à une réponse effectrice qui élimine ou neutralise l'antigène. Dans une telle réponse, les divers composants du système immunitaire sont capables de convertir l'évènement de reconnaissance initial en différentes réponses effectrices, chacune étant conçue spécifiquement pour éliminer un type particulier d'antigène. Une exposition ultérieure au même antigène peut induire une réponse mémoire, caractérisée par une réaction immunitaire plus rapide et plus intense, permettant un contrôle précoce de l'antigène, prévenant ainsi les infections.

Il existe différents types de lymphocytes : les lymphocytes naïfs (ceux qui n'ont pas encore rencontré d'antigène), les lymphocytes effecteurs (ceux qui ont ~~de~~ rencontré un antigène et qui réalisent une fonction comme produire une substance ou détruire directement un pathogène) et les lymphocytes mémoires (ceux qui se répandent de manière clonale en cas de réinfection, différenciation en une catégorie lymphocytaire à longue durée de vie, certains lymphocytes mémoires peuvent avoir une durée de vie très longue). Ces cellules mémoires ont pour rôle d'entraîner une réactivation et une expansion clonale la plus rapide possible après réinfection par le même antigène. Donc les cellules effectrices meurent, seules les cellules «mémoire» restent, elles induiront une réponse immunitaire plus rapide, plus forte et plus efficace lors d'une deuxième rencontre avec le même pathogène.

De même que les lymphocytes T, après une primo-invasion, les lymphocytes B garderont la « mémoire » de leur premier contact avec l'antigène. Cette maturation se traduit par une plus grande efficacité fonctionnelle. Les lymphocytes B mémoires présentant des Ac membranaires spécifiques permettant une réponse plus rapide si une seconde infection se présente. À la suite d'une rencontre avec un antigène, les lymphocytes T et B spécifiques de l'antigène prolifèrent et se différencient en cellules

mémoires. Ces lymphocytes mémoires sont reprogrammés pour répondre plus efficacement lors d'une réexposition à l'antigène. C'est l'une des raisons pour lesquelles on parle d'immunité adaptative, l'organisme s'adapte à son environnement en se préparant à des infections répétées par un même antigène.

Les cellules mémoires persistent dans presque tous les tissus et, généralement, tout au long de la vie de l'hôte. Lors d'une réexposition, la réponse secondaire est à la fois plus rapide, plus intense et plus efficace que la réponse primaire. Le principe de cette mémoire (mécanisme de mémorisation) est à la base du concept de la vaccination qui consiste, en réalité, en une éducation du système immunitaire, préparant ainsi l'organisme à de futures expositions au même antigène et lui permettant de répondre plus rapidement et plus efficacement.

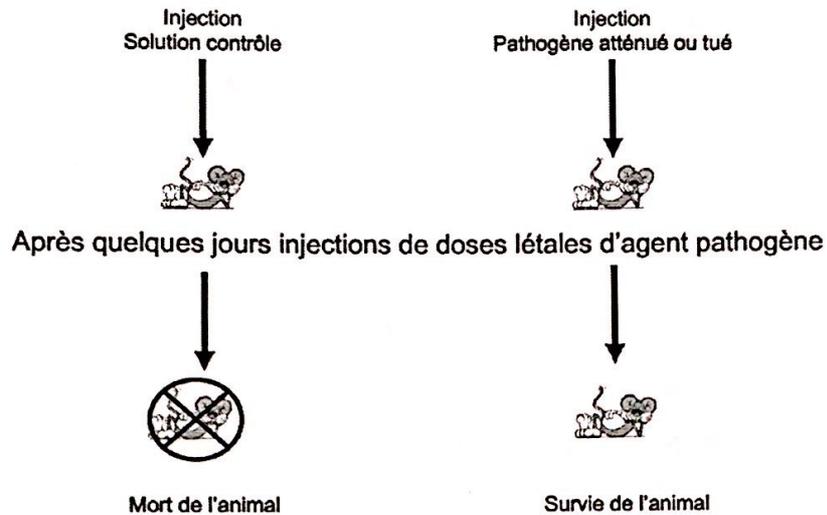
La vaccination est l'acquisition de l'expérience infectieuse sans danger. L'objectif de la vaccination est de permettre à l'individu de développer une protection active spécifique vis-à-vis d'un agent infectieux: le procédé consiste à introduire dans l'organisme une substance immunogène dont les caractéristiques structurales sont proches de celles de l'agent infectieux. Elle exploite la mémoire immunitaire

La vaccination est l'une des grandes victoires de la médecine moderne et constitue un outil essentiel de prévention et de lutte contre les maladies infectieuses dans le monde. C'est un moyen rentable et économique puisqu'il coûte beaucoup moins cher que le coût de la maladie. La vaccination confère au vacciné une protection individuelle. De plus, quand le nombre des vaccinés est important, la circulation de l'agent pathogène dans le milieu extérieur est ralentie, et par là même les chances d'être infecté diminuent pour tous, y compris les non vaccinés. C'est ce qu'on appelle une immunité collective, obtenue pour une proportion de vaccinés variable selon la contagiosité de l'agent pathogène. Enfin, lorsque l'agent pathogène ne circule plus, stoppé dans sa progression par l'absence de sujets réceptifs, on peut aboutir à l'éradication mondiale d'une maladie. C'est ce qui s'est produit pour la variole en 1977, et qui promet dans l'avenir d'arriver pour la rougeole et d'autres maladies infectieuses.

Actuellement la vaccination est devenue une science à part entière débutant par l'isolement de l'agent pathogène, sa culture, son atténuation ou son inactivation pour fabriquer un vaccin. Les étapes suivantes comportent l'étude de l'efficacité clinique et biologique, des effets indésirables et de l'acceptabilité par la population cible.

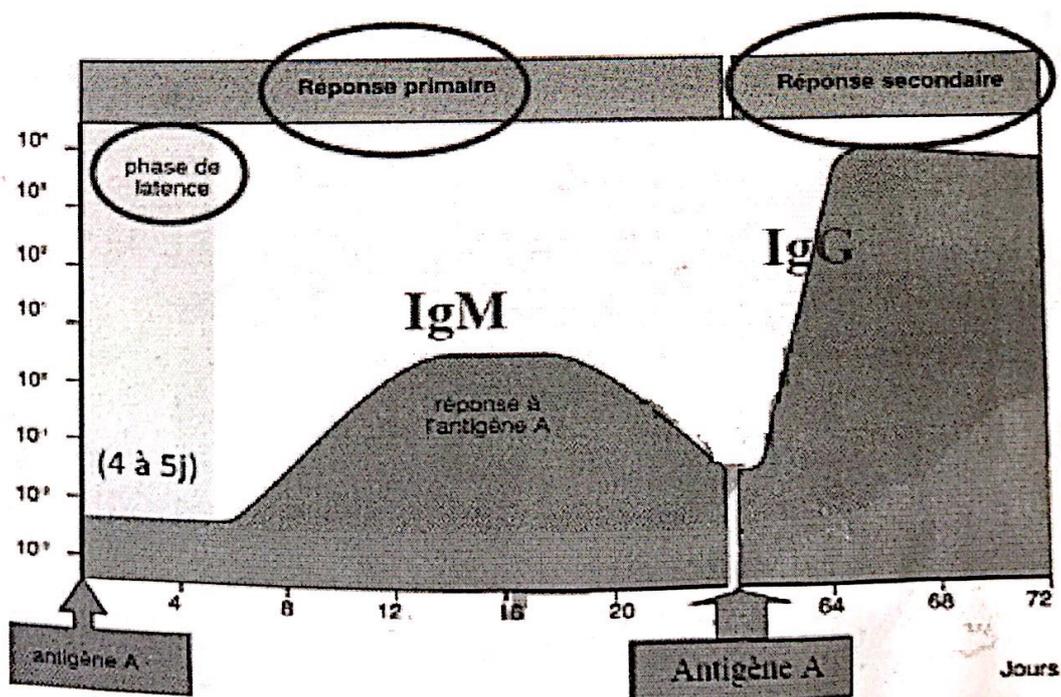
## Principe de la vaccination

Effet mémoire de la réponse immune (la vaccination)



Souris → Injection AgA → Prélèvement quotidien de sang → Dosage des Ac-AgA dans le sérum

- Temps de latence = sélection clonale (fixation Ag sur clone, prolifération et différenciation en plasmocytes et LB mémoires).
- Réponse primaire : production Ac faible (IgM) avec max au 16<sup>ème</sup> jour ; plateau puis décroissance
- Réinjection de l'Ag.
- Temps de latence court, réponse rapide 1 à 2 jours (= LB mémoire),
- Production Ac très forte (100 à 1000x), IgG.
- Durée très longue.



## Hybridomes et anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (ACM) sont produits naturellement par une même lignée des LB activées ou plasmocytes reconnaissant le même épitope d'un antigène. Afin de pouvoir être utilisés comme thérapie. Ils sont produits grâce à une cellule dite hybridome issue de la fusion entre un lymphocyte B et une cellule cancéreuse (myélome).

Les hybridomes possèdent en plus de la propriété de produire des anticorps (Ac spécifiques de l'antigène immunisant), apportée par le LB parental, le caractère d'immortalité en culture cellulaire (Une division cellulaire indéfinie qui assure la pérennité de l'anticorps cloné), apporté par l'autre cellule parentale, la cellule du myélome (lignée maligne de plasmocytes, capable de se multiplier indéfiniment). Tous les ACM d'un seul clone reconnaissent un seul type d'épitope (ou de déterminant antigénique, sur un antigène). Cette propriété offre une grande spécificité aux ACM qui sont capables de reconnaître des différences minimes entre molécules ou microorganismes. Elle est de ce fait mise à profit pour identifier, caractériser, rechercher et purifier une molécule donnée.

César Milstein et Georges Köhler (1975) ont été les premiers à décrire la technique de fusion d'un lymphocyte B provenant d'une souris (lymphocytes B provenant de la rate d'une souris préalablement immunisée par des injections successives d'un antigène donné) et d'une cellule de myélome (cellule provenant d'une lignée cancéreuse). Après un certain nombre d'étapes de clonage et de sélection, on obtient quelques clones de cellules ayant une partie des caractéristiques génétiques et physiologiques des cellules parentales. En particulier, on sélectionne les clones producteurs d'anticorps dirigés contre l'antigène utilisé pour l'immunisation de la souris (héritage du lymphocyte). Par ailleurs, les cellules obtenues doivent pouvoir être cultivées. On sélectionne donc les cellules ayant les caractéristiques "d'immortalité" (héritage génétique des cellules myélomateuses). Les hybridomes obtenus, les plus intéressants, sont ceux qui peuvent être cultivés de manière à produire le maximum d'anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux sont un moyen d'investigation puissant, par leur spécificité prédéterminée et leur obtention en quantité illimitée, notamment in vitro. Ces avantages des anticorps monoclonaux suffisent à expliquer l'essor considérable de la méthode depuis sa création.