

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Année Universitaire 2020/2021

Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSB d'Oran)

Département du Second Cycle

Polycopie Pédagogique

Matière : Immunologie et immunogénétique

Niveau :

Option : Biologie Moléculaire

Spécialité : Biotechnologie

Filière : Sciences Biologiques

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Réalisé par :

Dr. Wassila ILIAS

Matière enseignée pendant les Années Universitaires :

2018/2019

2019/2020

2020/2021

AVANT-PROPOS

Cet ouvrage est réalisé après trois années d'enseignement de la matière « immunologie et immunogénétique » au niveau de l'École Supérieure en Sciences Biologique d'Oran –ESSBO-. Cette matière est enseignée aux étudiants de la première année du deuxième cycle des études biotechnologiques, spécialité Biologie Moléculaire.

Actuellement, je suis chargée de cours et des travaux dirigés (TD) de ce module « immunologie et immunogénétique » et du module de « métagénomique ». Parallèlement, j'assure les ateliers de « Biologie Moléculaire » ainsi que les ateliers de « Biochimie et Biologie Moléculaire ».

Dans le cadre de la préparation de l'habilitation universitaire pour le passage au grade de rang magistral "Maître de Conférences A", j'ai choisi de présenter un polycopié englobant le cours de la matière de « immunologie et immunogénétique ». Ce module représente une unité fondamentale dans le programme de la première année.

Cet enseignement détaille huit chapitres principaux en immunologie et immunogénétique à savoir : les fondamentaux de l'immunologie innée et adaptative, le système HLA, Les immunoglobulines, la signalisation immunologique et l'immunothérapie.

SOMMAIRE

Liste des figures.....	6
Liste des tableaux	7
Introduction à l'immunologie et l'immunogénétique.....	8
Chapitre 1: Rappel des bases de l'immunologie.....	9
1. Les composants du système immunitaire	9
1.1. Les organes et les tissus.....	9
1.1.1. Les organes lymphoïdes primaires	9
1.1.2. Les organes lymphoïdes secondaires.....	9
1.2. Les cellules immunitaires.....	10
1.2.1. Les cellules de l'immunité innée.....	10
1.2.2. Les cellules de l'immunité adaptative	12
1.2.3. Les cellules immunocompétentes.....	12
2.3. Les récepteurs.....	14
2.3.1. Le TCR et BCR	14
2.3.1. Les cytokines et les interleukines.....	15
3. L'immunité innée	15
4. L'immunité adaptative	17
4.1. L'immunité cellulaire	17
4.2. L'immunité humorale.....	17
5. Le système immunitaire en action.....	18
Chapitre 2 : Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH et HLA).....	21
1. Le complexe HLA	21
2. Organisation génomique de la région HLA.....	21
2.1. Le HLA de classe I.....	21
2.2. Le HLA de classe II.....	22
2.3. Le HLA de classe III	22
2.4. Les HLA de classe I non classiques	23
3. Les caractéristiques génétiques de gènes HLA classiques	23
3.1. Caractéristiques génétiques communes aux deux classes	23
3.1.1. Polymorphisme génétique multiallélique:	23
3.1.2. Polymorphisme de la protéine correspondante (allotype HLA).....	24
3.1.2.1. Codominance et transmission en bloc	24
4. Nomenclature	25
5. Expression des gènes CMH.....	26
5.1. Expression des gènes CMH de classe I.....	26
5.2. Expression des gènes CMH de classe II.....	26
5.3. Présentation des antigènes.....	26

5.4.	Les produits des gènes CMH.....	27
6.	Formation des complexes CMH-peptides	28
6.1.	Les molécules de classe I présentent des fragments de protéines endogènes.....	29
6.2.	Les molécules de classe II présentent des protéines exogènes	30
6.3.	Reconnaissance des molécules CMH à la surface de la cellule par les lymphocytes T	31
7.	Autres molécules HLA et molécules apparentées	33
7.1.	Reconnaissance des molécules apparentées au HLA	33
Chapitre 3: Les immunoglobulines		34
1. Les immunoglobulines		34
2.	Structure générale d'une molécule d'immunoglobuline	34
2.1.	Rappel historique.....	34
2.2.	Structures du système des immunoglobulines.....	35
2.2.1.	Les chaînes lourdes.....	35
2.2.2.	Les chaînes légères	36
2.3.	Sensibilité enzymatique de la molécule des immunoglobulines	36
3.	Génétique Moléculaire et diversité des Immunoglobulines	37
3.1.	Commutation de classe.....	37
4.	Spécificités antigéniques des immunoglobulines.....	38
4.1.	Déterminants isotypiques	38
4.2.	Déterminants allotypiques	38
4.3.	Déterminants idiotypiques.....	38
4.	Fonction des immunoglobulines.....	39
Chapitre 4: Communication et signalisation cellulaire.....		40
1.	La communication cellulaire	40
2.	Principes généraux de la signalisation cellulaire.....	40
2.1.	Modes de transmission intracellulaire	41
2.1.1.	PARACRINE	41
2.1.2.	AUTOCRINE.....	42
2.1.3.	ENDOCRINE.....	42
2.1.4.	JUXTACRINE	42
2.2.	Les différentes étapes de la signalisation cellulaire.....	42
2.2.1.	Le devenir d'une cellule dépend de l'intégration de différents signaux.....	43
2.2.2.	Le réseau de transduction des signaux	43
3.	Signalisation des récepteurs immunologiques.....	44
3.1.	La signalisation des récepteurs des cytokines	44
3.1.1.	Les cytokines.....	44
3.1.2.	Classification	44
3.1.3.	Les voies de transduction de signaux	47
3.1.4.	La voie JAK/STAT.....	47

3.1.5. Fonctionnement de la voie JAK STAT	48
3.2. La signalisation lymphocytaire.....	49
3.2.1. La signalisation des lymphocytes B	49
3.2.1.1 .Structure du BCR	49
3.2.1.2. Signalisation du BCR	50
3.2.2. La signalisation du récepteur TCR.....	53
4. Altération de la signalisation et cancers	53
4.1. Lymphocytes B à l'état pathologique.....	53
4.1. Leucémie Lymphoïde Chronique	54
4.2. Signalisation du BCR dans la LLC	54
Chapitre 5 : Les biothérapies et la thérapie ciblée	59
1. La biothérapie.....	59
1.1. Définition.....	59
1.3. Les stratégies	60
2. Les capacités distinctives des cancers	60
3. la biothérapie : la thérapie génique.....	61
3.1. Définition.....	61
3.1. Les étapes de la thérapie génique somatique ex vivo utilisant des virus modifié comme vecteur61	
5. La biothérapie : Les anticorps monoclonaux.....	65
5.1. Définition.....	65
5.2. Mode d'action.....	65
5.2.1. Dirigés contre une cible cellulaire précise dont ils bloquent l'action.....	65
5.2.2. Dirigés contre un facteur de contrôle de la croissance cellulaire	65
5.2.3. Couplés à d'autres agents anti-cancéreux.....	65
6. Les thérapies ciblées.....	65
6.1. Définition.....	65
6.2. Mode d'action.....	66
6.3. Classification des molécules de la thérapie ciblée.....	67
6.3.1. Les anticorps monoclonaux	67
6.3.2. Les petites molécules.....	67
6.3.3. Les inhibiteurs de tyrosine kinase	67
6.3.4. Les inhibiteurs de la transduction des signaux produits	67
6.3.5. Les inhibiteurs d'enzymes	68
6.4. Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées	68
7. La thérapie ciblée dans la LLC.....	68
7.1. Les molécules thérapeutiques ciblant la signalisation du BCR dans la LLC	68
7.2. Les molécules thérapeutiques ciblant les récepteurs dans la LLC	69
Chapitre 6 : Immunothérapies : de la paille à la clinique.....	71
1. Immunologie en biothérapie.....	71

1.1. Définition.....	71
2.2. Mode d'action.....	71
5. Immunothérapie : cible les inhibiteurs de checkpoints	71
5.1. Les inhibiteurs de checkpoints : CTLA-4 et son ligand	71
5.2. Les inhibiteurs de checkpoints : PD1 et son ligand.....	72
6. CAR T-cells : Une avancée majeure dans l'immunothérapie des leucémies ?	73
7. Méthodologie et statistique des essais cliniques.....	73
a. Définition.....	73
b. Méthodologie et statistique des essais cliniques.....	74
c. Méthode d'identification des essais cliniques en cours.....	74
d. Les différentes phases d'un essai clinique.....	74
4.2.1. Phase I	75
4.2.2. Phase II	75
4.2.3. Phase III.....	76
4.2.4. Phase IV	76
8. Principes des essais cliniques	77
8.1. Principe de comparaison	77
8.2. Principe de causalité.....	77
8.3. Principe de signification	77
9. Qualité et réglementaire en biothérapies	77
Chapitre 7 : Les anticorps monoclonaux et polyclonaux.....	79
1. De l'exploitation des propriétés immuno-modulatrices des cellules NKT invariantes en immunothérapie.....	79
1.1. Les cellules NKT.....	79
1.2. Les lymphocytes T et les iNKT.....	79
2. Rôle régulateur des iNKT dans les maladies auto-immunes	80
2.1. Exemple : Diabète de type 1.....	80
2.2. Le rôle fonctionnel des cellules iNKT.....	80
2.3. Mécanismes de régulation du diabète de type 1 par les lymphocytes iNKT.....	81
2.1. Les vecteurs non viraux de thérapie génique	81
2.4. Les vecteurs non viraux de thérapie génique.....	82
2.4.1. Les liposomes classiques.....	82
2.4.2. Les vecteurs synthétiques.....	83
2.4.3. Les vecteurs plasmidiques ou les plasmides.....	83
3. Stratégies vaccinales anti-VIH	83
3.1. Immunopathologie de l'infection par le VIH.....	83
3.2. Immunopathologie du VIH anomalies des cellules T	84
3.2.1. Déplétion des lymphocytes CD4.....	84
3.2.2. Anomalies fonctionnelles des lymphocytes T	84
3.3. Stratégies vaccinales anti-VIH	86

3.3.1.	Virosome et application vaccinale anti-VIH	86
3.3.2.	Nouvelles stratégies vaccinales contre HIV	86
4.	Design antigénique et vaccination anti-tumorale	87
4.1.	Vaccination anti tumorale.....	87
	Désensibilisations cutanées	89
6.3.	La désensibilisation, ou immunothérapie	90
Chapitre 8: Thérapie génique; Thérapies cellulaire et stratégies vaccinales.....		92
1.	Electrotransfert : principes et applications à des modèles animaux	92
2.	Thérapie cellulaire des hémopathies malignes	92
2.1.	Les cellules CART (Chimeric Antigenic Receptor– T cells)	92
2.2.	Les différentes générations de CAR.....	92
2.3.	Lymphocytes T modifiés par transfert de gène	93
	95
2.5.	Mode d'activation des lymphocytes T conventionnels et des CAR-T cells.....	95
3.	Vecteurs oncorétroviraux et lentiviraux recombinants défectifs: applications thérapeutiques	96
4.	Les déficits immunitaires héréditaires et leurs thérapeutiques	97
5.	Vecteurs adénovirus en thérapie génique	98
5.1.	Les adénovirus.....	98
5.2.	Les adeno-associated virus (AAV).....	98
7.3.	Application en thérapie génique	99
6.	Cellules dendritiques et applications thérapeutiques.....	100
6.1.	La génération des cellules de Langerhan.....	100
6.2.	La génération des CD plamocytoïdes.....	100
6.3.	La génération de CD myéloïdes à partir de monocytes.....	100
7.	Les outils: techniques avancées de cytométrie	101
7.1.	La cytométrie en flux	101
7.2.	Principe de la cytométrie en flux.....	101
	Reference bibliographique	102

Liste des figures

Figure 1.1. Localisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires.

Figure 1.2. Organisation générale du système immunitaire.

Figure 1.3. La structure des récepteurs membranaires des LB et LT, le BCR et le TCR respectivement.

Figure 1.4. Immunité cellulaire et immunité humorale.

Figure 1.5. Le système immunitaire en action

Figure 2.1. Organisation génomique de la région HLA.

Figure 2.2. Exemple de nomenclature du gène HLA. Selon *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* (Avril 2011).

Figure 2.3. Structure moléculaire des molécules de classe I et de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Figure 3.1. Séparation électrophorétique des protéines du sérum

Figure 3.2. Exemple monomère d'IgG1.

Figure 4.1. Vue générale des voies de transmission permettant aux messagers moléculaires extracellulaires d'induire les réponses intracellulaires.

Figure 4.2. Un exemple du système de signaux : autocrine et paracrine.

Figure 4.3. Une cellule animale dépend de multiples signaux extracellulaires.

Figure 4.4. Exemple de pléiotropie.

Figure 4.5. Exemple de Redondance.

Figure 4.6. Exemple d'antagonisme.

Figure 4.7. Exemple d'activité en cascade.

Figure 4.8. Exemple d'activité en cascade et en réseau.

Figure 4.9. La voie JAK STAT

Figure 4.10. La structure du BCR.

Figure 4.11. Représentation schématique de la transduction du signal par le BCR et les voies de signalisation.

Figure 4.12. Représentation schématique de la transduction du signal par le BCR et les voies de signalisation dans la LLC

Figure 5.1. Les capacités distinctives des cancers

Figure 5.2. Les étapes de la thérapie génique somatique ex vivo utilisant des virus modifiés comme vecteur.

Figure 5.3. Plasticité des cellules souches.

Figure 5.4. La cellule souche embryonnaire.

Figure 5.5. Les cibles de la thérapie ciblée.

Figure 6.1. Principaux mécanismes de régulation de l'activation du lymphocyte T par CTLA-4/CD28.

Figure 6.2. Mécanismes d'action des formes solubles de PD-L1 associées au phénomène de résistance des traitements par anticorps anti-PD-L1.

Figure 7.1. Lymphocytes T et lymphocytes NKT.

Figure 7.2. Mécanismes de régulation du diabète de type 1 par les lymphocytes iNKT.

Figure 7.3. Évolution de la lymphopénie T CD4+ et des RI au cours de l'infection naturelle de l'infection par le VIH.

Figure 7.4. Interactions du virus et du système immunitaire en Primo-infection.

Figure 7.5. Les différents vaccins anti VIH à l'étude.

Figure 7.6. Mécanismes impliqués dans l'immunothérapie spécifique.

Figure 8.1. Les différentes générations de CAR.

Figure 8.2. Lymphocytes T modifiés par transfert de gène

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Tableau représentatif des rôles des cellules de l'immunité innée et adaptative et leurs récepteurs.

Tableau 2.1. Tableau représentatif des allèles de HLA classe I et II, figurant actuellement sur la database IGMT/HLA (Avril 2021).

Tableau 3.1. Tableau représentatif de quelques dates clés de la découverte des immunoglobulines

Tableau 4.1. Comparaison de la signalisation du BCR de LLC avec des lymphocytes B normaux.

Tableau 5.1. Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées.

Tableau 5.2. Les molécules thérapeutiques ciblant la signalisation du BCR dans la LLC.

Tableau 7.1. Antigènes associés aux tumeurs mammaires

Tableau 8.1. Les différents types de système CAR-T

Introduction à l'immunologie et l'immunogénétique

L'immunologie est la science moderne qui s'intéresse au fonctionnement du système immunitaire. On attribue sa paternité à Edward JENNER qui a démontré qu'il était possible de se protéger contre la variole (1796). Depuis, grâce à ses précurseurs, l'immunologie s'est développée au point de devenir une science majeure du vivant. L'immunologie s'est intéressée pendant longtemps presque exclusivement aux mécanismes de défense anti-infectieuse mais, progressivement, on s'est rendu compte de l'importance de la réponse immunitaire dans la plupart des grandes maladies humaines, comme l'allergie, les maladies néoplasiques et surtout les maladies inflammatoires et auto-immunes. Reste à comprendre comment ce système fonctionne.

Avec le progrès de la biologie moléculaire, et l'intérêt que portent les biologistes à la génétique pour étudier les gènes, la transmission des caractères héréditaires et la nature et la fonction de ce qui est transmis. Est née une nouvelle discipline 'IMMUNOGÉNÉTIQUE'.

L'immunogénétique est la science qui étudie le rôle des gènes dans les réactions immunitaires de l'organisme par l'étude des bases génétiques de la défense de l'hôte contre les infections. Le système immunitaire assume l'une des grandes fonctions physiologiques des Vertébrés : l'aptitude à la reconnaissance d'un nombre prodigieux de structures moléculaires distinctes ; les antigènes. Un antigène est classiquement réputé « étranger » à l'organisme chez lequel il provoque une réponse immunitaire. D'où la conception selon laquelle le système immunitaire a pour fonction essentielle la distinction du « soi » (les divers constituants de son propre organisme) et du « non-soi ». Une complète compréhension du système immunitaire nécessite de comprendre la façon dont les entités génétiques et épigénétiques collaborent ensemble, afin de produire une multitude de comportements physiologiques et pathologiques caractéristiques de ce système. Le « réseau immunitaire » comprend toutes les connections entre les cellules ainsi que la somme des interactions entre les produits des gènes dans la cellule. De plus, l'immunogénétique tire ses enseignements des « expériences de la nature » que sont les multiples pathologies humaines liées au système immunitaire, qui ne sont pas secondaires à des facteurs environnementaux. Ces pathologies offrent des informations précieuses sur la fonction des facteurs et des gènes défectueux. Avant de voir plus en détail les gènes de l'immunité, leur régulation et leur implication dans les différentes pathologies humaines, un bref rappel de notions de génétique et d'anomalies génétiques s'impose.

Chapitre 1: Rappel des bases de l'immunologie

1. Les composants du système immunitaire

Le SI est constitué d'un ensemble complexe d'organes individualisés et de tissus entre lesquels circulent en permanence des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Son organisation lui confère trois propriétés essentielles :

- Capacité d'échanges d'informations par des contacts membranaires intercellulaires, ou par la libération de médiateurs solubles.
- Régulation permettant de préserver l'homéostasie pour aboutir à une réponse immunitaire adaptée.
- Un rôle effecteur capable de protéger l'intégrité de l'organisme.

La perturbation de l'un de ces systèmes est à l'origine de graves dérèglements pathologiques comme des déficits immunitaires, des maladies auto-immunes ou des états d'hypersensibilité.

1.1. Les organes et les tissus

1.1.1. Les organes lymphoïdes primaires

- Le thymus : est un organe lympho-épithélial. Il est le site de maturation et d'éducation des lymphocytes T (Figure 1.1).
- La moelle osseuse : Tous les éléments cellulaires du sang dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes (GR, plaquettes, et les deux principales catégories de GB).

L'intégralité de la maturation des lymphocytes B se réalise dans la moelle osseuse.

1.1.2. Les organes lymphoïdes secondaires

Les organes lymphoïdes secondaires sont classés en organes systémiques (rate et nœud lymphatique) et organes muqueux (Figure 1.1).

Caractéristiques communes :

- Ils dépendent des organes lymphoïdes primaires, et ne se développent pas en l'absence de fonctionnement normal des organes lymphoïdes primaires
- Ils se développent surtout après la naissance au contact des antigènes de l'environnement

- Ils contiennent des zones où se localiseront de façon privilégiée les lymphocytes T (zone paracorticale des ganglions lymphatiques par exemple), et les lymphocytes B (centres germinatifs appelés aussi follicules lymphoïdes)

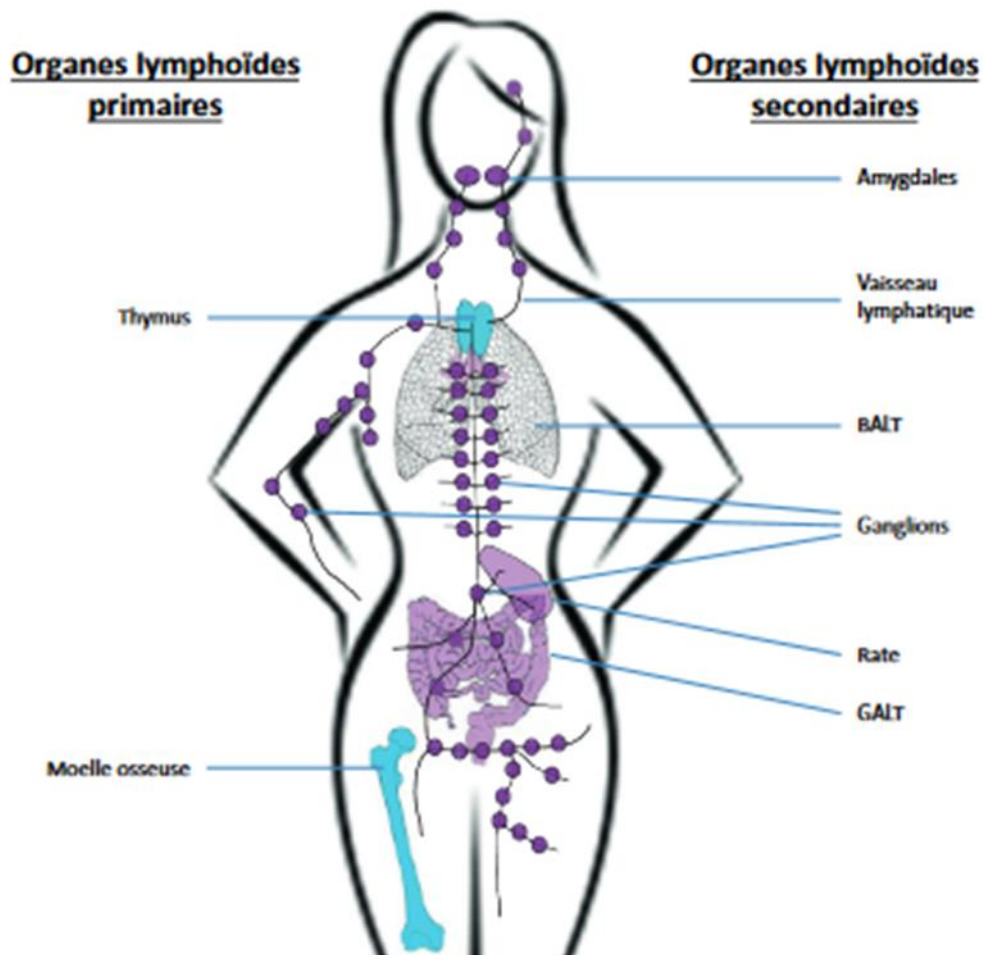


Figure 1.1. Localisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires.

1.2. Les cellules immunitaires

Les réponses immunitaires sont assurées par divers cellules spécialisées de l'immunité innée et adaptative (tableau 1.1).

1.2.1. Les cellules de l'immunité innée

1.2.1.1. Les granulocytes

Les granulocytes se divisent en trois lignées distinctes : neutrophiles, éosinophiles et basophiles.

1.2.1.2. Les monocytes/macrophages

Les monocytes ont également un cytoplasme granuleux contenant de nombreuses enzymes. Moins nombreux que les granulocytes, ils circulent dans le sang et adhèrent aux parois vasculaires avant de migrer dans les tissus en réponse à certains facteurs chimiotactiques, où ils s'y différencieront en macrophages.

1.2.1.3. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont localisées dans de nombreux tissus et organes dans un état immature ayant une importante capacité de capture d'antigènes.

1.2.1.4. Les cellules NK

Les lymphocytes NK ou cellules Natural Killer sont des cellules cytotoxiques localisées dans le sang et les organes lymphoïdes périphériques. Ils reconnaissent et détruisent les cellules infectées, endommagées ou ciblées par des anticorps de type IgG.

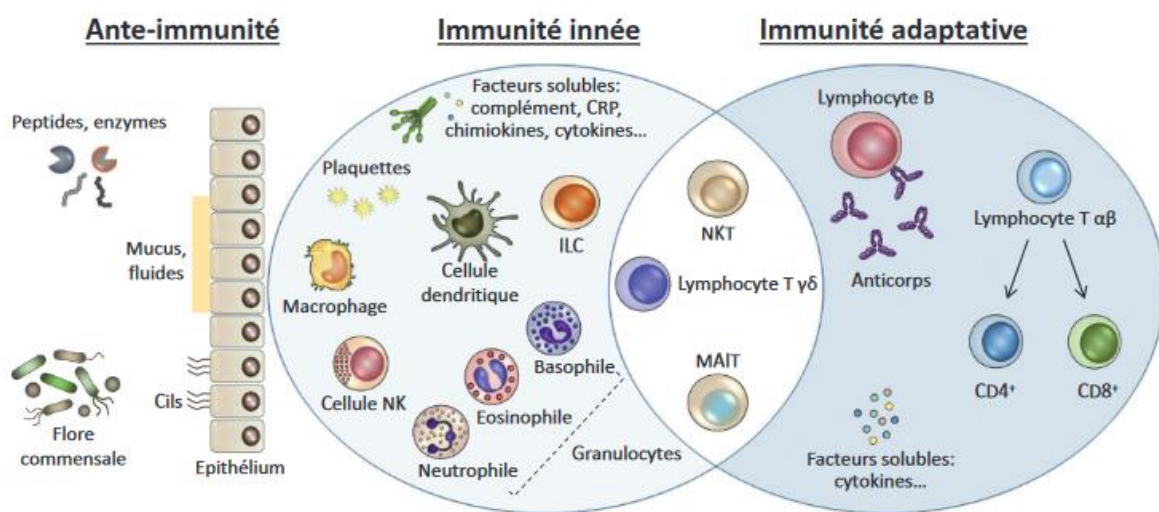


Figure 1.2. Organisation générale du système immunitaire. Schéma illustre l'ensemble des acteurs du système immunitaire, qu'ils fassent partie de l'anté-immunité, de l'immunité innée et/ou adaptative, qu'ils soient de type moléculaire, microbien ou cellulaire.

1.2.2. Les cellules de l'immunité adaptative

Il s'agit principalement des lymphocytes B et T, les lymphocytes B étant responsables de la réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) et les lymphocytes T des réponses cellulaires (auxiliaire, cytotoxique ou régulatrice).

1.2.3. Les cellules immunocompétentes

Les cellules-barrière (ou cellules-échange) de l'organisme, présentes sur les sites de surface en contact avec l'environnement, sont en fait très actives et immunocompétentes.

a. Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales ne sont pas de simples barrières mécaniques. Elles participent à la réponse immunitaire innée car elles sont capables de sécréter des peptides antimicrobiens. Il s'agit de cellules sentinelles susceptibles de produire des cytokines et des chimiokines en cas de danger (signaux d'alerte). Ce sont aussi des cellules impliquées dans la sécrétion des immunoglobulines (pièce sécrétoire associée aux IgA dimériques dans les muqueuses) ou dans leur absorption (FcRn). Ce sont enfin des cellules informatives dans le cas des cellules M des plaques de Peyer.

a. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont également des cellules sentinelles et pro-inflammatoires capables de produire des chimiokines en présence de signal de danger. Ce sont des cellules adhésives intervenant activement dans la diapédèse au cours de l'inflammation aiguë. Dans les HEV, elles sont morphologiquement distinctes sous forme de cellules cuboïdes qui assurent le passage contrôlé des cellules lymphoïdes dans les organes lymphoïdes secondaires.

b. Les plaquettes

Les plaquettes ne sont pas des éléments nucléés. Elles dérivent des mégacaryocytes qui se développent dans la moelle osseuse. Elles présentent des similitudes avec les cellules endothéliales car leurs granules alpha ressemblent aux corps de *Weibel Palade*. Elles sont

proinflammatoires, adhésives et jouent un rôle non seulement dans la coagulation mais également dans l'immunité innée en recrutant les cellules phagocytaires aux sites inflammatoires.

Tableau 1.1. Tableau représentatif des rôles des cellules de l'immunité innée et adaptative et leurs récepteurs.

Cellules	Rôle	Récepteur
IMMUNITE INNEE		
Macrophages	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose et activation des mécanismes antimicrobiens. • Présentation des antigènes dans les organes lymphoïdes. • Sécrétion de médiateurs chimique (ex : cytokines). 	TLR CMH I Après activation : CMH II B7 CD40
monocyte	<ul style="list-style-type: none"> • Migration vers le site infecté • Sécrétion de médiateurs chimique • Se transforme en macrophage ou cellule dendritique dans les tissus 	
Polynucléaires : Neutrophile	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose et activation des mécanismes antimicrobiens • Sécrétion d'enzymes et de cytokines • Destruction des parasites 	INTEGRINE exemple : CAM
mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Cellule sentinelle • Sécrétion de médiateurs chimiques • jouent un rôle clé dans le processus inflammatoire. 	CD34+, KIT+ ou SCF, CD13+
Cellules NK	<ul style="list-style-type: none"> • Lyse « indépendante de l'Ag », des cellules infectées ou tumorales 	KIR KAR
Cellules dendritiques	<ul style="list-style-type: none"> • « attrape » les Ag par phagocytose et les présente dans les organes lymphoïdes • Phagocytose des agents microbiens • Sécrétion de cytokines 	DEC 205 CMH II CMH I
IMMUNITE ADAPTATIVE		
Lymphocytes T	<ul style="list-style-type: none"> • Coopération avec les LB • Coopération avec d'autres cellules • Effet cytotoxique sur les cellules infectées et tumorales exprimant des Ag anormaux 	TCR LT CD8+ : CD8, CD25 LT CD4+ : CD4, CD3 CMH II CMH I
Lymphocytes B	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion d'anticorps • Présentation de l'antigène • Sécrétion de cytokines 	BCR Les Igs de membrane CMH II CMHI B7
LB mémoires	<ul style="list-style-type: none"> • rôle de mémoriser les propriétés de 	TLR

	l'antigène les ayant activés, afin de créer une réponse immunitaire plus rapide, plus longue, plus intense et plus spécifique dans le cas d'une seconde infection par ce même antigène (réponse immunitaire secondaire).	BCR CMH II CMH I
Plasmocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Intervient dans la réponse immunitaire humorale • Sécrétion des anticorps spécifiques aux antigènes • La forme du stade finale de la différenciation des LB 	LAG-3
Les Th1	<ul style="list-style-type: none"> • La différenciation des LT4 • le sens Th1 et la réponse immunitaire adaptative qui se développera sera une réponse à médiation cellulaire 	
Les Th2	<ul style="list-style-type: none"> • La différenciation des LT4 • le sens Th2 et la réponse immunitaire sera à médiation humorale. 	

2.3. Les récepteurs

2.3.1. Le TCR et BCR

La particularité entre LT et LB apparaît leur zone de développement est les récepteurs membranaires exprimés par tous les précurseurs de LB et LT (Figure 1.3). Les récepteurs des cellules T (TCR) et des cellules B (BCR) sont spécifiques à leur cellules LT et LB, respectivement.

Ces récepteurs BCR et TCR ont une forte ressemblance au CMH sont des protéines transmembranaires avec un ancrage membranaire avec une grande partie extracellulaire beaucoup développée par rapport à la partie intracellulaire.

Les BCR sont de immense variété et variabilité suite à des mécanismes des remaniements des gènes. Le même individu représente une grande variété de LB différents de leur BCR au contraire de CMH qui varie d'un individu à un autre. Ces récepteurs confèrent à la cellule qui les porte une capacité à reconnaître un peptide différent.

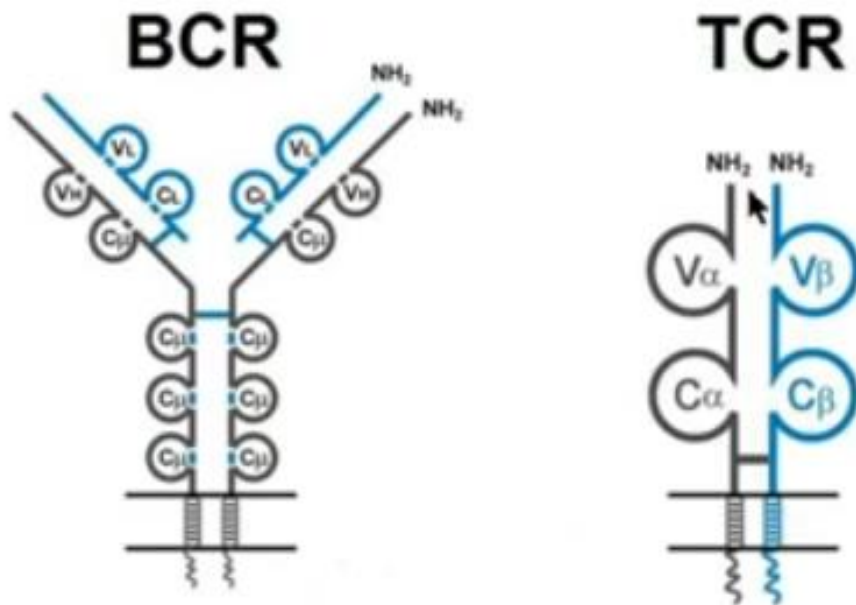


Figure 1.3. La structure des récepteurs membranaires des LB et LT, le BCR et le TCR respectivement.

2.3.1. Les cytokines et les interleukines

Les cytokines sont des médiateurs solubles ou membranaires assurant la communication entre les cellules. Au cours de la réponse innée, toutes les cellules immunitaires ainsi que les cellules épithéliales et endothéliales peuvent produire des cytokines. On distingue principalement :

- Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL- 1, l'IL-6, l'IL-12, les IFN α , β et γ , l'IL-15.
- Les cytokines chimio-attractantes (chimiokines) comme CXCL8 (IL-8).
- Les cytokines régulatrices de l'inflammation comme l'IL- 10 ou le TGF β .

3. L'immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Après avoir traversé les barrières de défenses naturelles (peau, muqueuse). Elle est une succession de réponses simples et immédiates qui permettent d'éliminer rapidement des

agresseurs extérieurs. Cette réponse immédiate repose sur la phagocytose instantanée des pathogènes dans le cadre d'une réponse inflammatoire de défense. Cette immunité innée est déclenchée par divers constituants microbiens (sucre, lipides, acide nucléique) très conservés.

L'environnement microbien peut activer les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, macrophages, polynucléaires, mastocytes...) par différentes voies. Cette activation est nécessaire à leur fonction phagocytaire mais surtout elle est indispensable pour leur permettre d'exercer leur action de présentation de l'antigène.

Ainsi, Ces microbes peuvent activer les protéines du complément et des lectines (manose) dont les composés vont interagir avec des récepteurs spécifiques à la surface de ces cellules. Aussi, au niveau moléculaire les microbes libèrent des petites particules appelées '*Pathogen ou danger- associated molecular patterns*' PAMPs ou DAMPs (comme les protéines virales, le lipopolysaccharide bactérien ou des sucres de la paroi fongique) sont spécifiquement détectés par des récepteurs appelés « *pattern recognition receptors* » (PRR), situés à la surface des cellules immunitaires. Les PRR ont été classés en quatre familles principales et ils sont largement conservés au cours de l'évolution, puisqu'on les retrouve chez presque tous les eucaryotes (**figure 1.1**) :

- les « *Toll-like receptors* » (TLR), situés au niveau de la membrane cellulaire, et pouvant détecter les pathogènes à l'extérieur de la cellule ou dans les endosomes ou lysosomes
- les « *C-type lectin receptors* » (CLR), situés au niveau de la membrane cellulaire ou dans l'espace extracellulaire ;
- les « *retinoid acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors* » (RLR)
- les « *NOD-like receptors* » (NLR) tous deux situés à l'intérieur du cytoplasme.
- D'autres PRR cytosoliques ont été décrits, comme certaines kinases, des récepteurs à ADN ou des pentraxines.

La reconnaissance des pathogènes par les PRR active de multiples voies de signalisation intracellulaires aboutissant à la production de chémokines et cytokines, qui déclenchent un processus d'inflammation locale et/ou à distance (fièvre), puis la mise en route de la réponse immunitaire adaptative, en participant à la maturation des cellules dendritiques

Cette activation entraîne :

- 1) une activation de la cellule phagocytaire qui libère différentes substances de la réaction inflammatoire aiguë (enzyme, NO, PG), permettant la vasodilatation et le chimiotactisme local,
- 2) la production de molécules de l'immunité, permettant l'activation des cellules (LT et LB) de l'immunité adaptative (HLA, molécule de co-stimulation, cytokines),
- 3) la présentation d'antigènes bactériens ("préparés" par la phagocytose) par les molécules HLA.

4. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative est indispensable pour s'adapter à des variations rapides des agresseurs (comme la variation génétique des virus) qui sont capables, par des leurres ou des mimétismes, d'échapper au système immunitaire. Un des exemples est l'encapsulage de certaines bactéries, comme les pneumocoques qui empêchent la phagocytose. Dans ce cas, c'est le développement d'anticorps anti-pneumocoque qui permet de neutraliser la bactérie. Cette immunité repose donc sur la capacité des lymphocytes T et B à répondre de façon adaptée à toute agression, même subtile.

4.1. L'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire permet à l'être humain de se défendre de manière spécifique contre une infection. Elle mobilise plusieurs types de cellules humaines, notamment les cellules suivantes (figure 1.4) et (Tableau 1.1) :

- Lymphocytes T auxiliaires (ou *helper*), qui sont des cellules CD4 : CD signifie cluster de différenciation 4, CD4 est une glycoprotéine exprimée à la surface des lymphocytes T qui permet l'interaction avec des cellules humaines pouvant présenter un antigène ;
- Lymphocytes T cytotoxiques, qui sont des cellules CD8 : CD8 est une glycoprotéine exprimée à la surface des lymphocytes T qui permet de reconnaître une cellule humaine infectée.

4.2. L'immunité humorale

Les lymphocytes B étant responsables de la réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) et les lymphocytes T des réponses cellulaires (auxiliaire, cytotoxique ou régulatrice) (figure 1.4) et (Tableau 1.1).

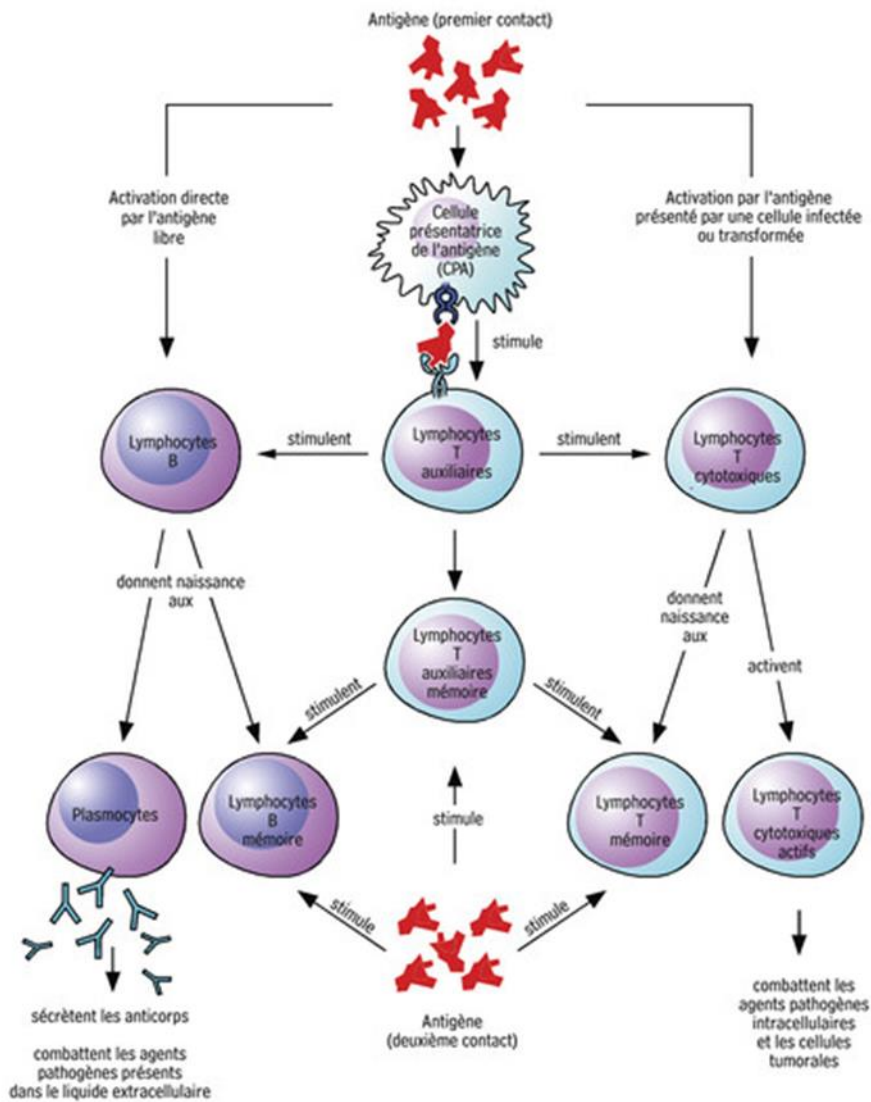


Figure 1.4. Immunité cellulaire et immunité humorale.

5. Le système immunitaire en action

Au cours de cette partie, nous prendrons l'exemple d'une réponse immunitaire à une infection bactérienne extra-cellulaire avec une porte d'entrée cutanée (figure 1.5). À l'état basal, l'épiderme joue une barrière physique naturelle empêchant la pénétration de la bactérie pathogène.

Cette protection est renforcée par une compétition pour les nutriments avec la flore commensale cutanée ainsi que la présence de peptides et enzymes antibactériens.

Une rupture de cette barrière (coupure, piqûre...) est donc nécessaire afin que la bactérie pénètre dans l'organisme. À ce moment-là, les cellules immunitaires innées résidentes du tissu sous-cutané, macrophages et cellules dendritiques immatures, vont pouvoir reconnaître comme anormale (PAMPs et signal de danger) la présence de ces bactéries *via* leurs immunorécepteurs (PRRs), les internaliser par phagocytose puis initier une réponse inflammatoire. La principale conséquence est une modification de la perméabilité vasculaire permettant aux cellules et aux protéines sanguines de traverser l'endothélium, en particulier les granulocytes neutrophiles jouant un rôle crucial dans l'élimination des bactéries, les immunoglobulines et le complément. En parallèle, les cellules dendritiques immatures, suite aux signaux dangers reçus, entament un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. C'est ici qu'elles interagiront avec les cellules du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes B et les lymphocytes T CD4⁺, capables de reconnaître les antigènes bactériens *via* leur immunorécepteur de surface.

Cette interaction tripartite est indispensable afin d'engendrer une activation efficace du lymphocyte B et du lymphocyte T qui vont alors proliférer de manière clonale et donner naissance à des lymphocytes mémoires qui joueront un rôle crucial dans le cas d'une deuxième infection. Les lymphocytes B activés générés poursuivent également leur maturation afin de devenir des plasmocytes, cellules productrices d'anticorps dirigés contre les protéines bactériennes qui diffuseront dans l'ensemble de l'organisme *via* la circulation sanguine.

Au niveau du site de l'infection, ces anticorps auront la capacité de détruire directement les bactéries par activation du complément ou bien de favoriser leur phagocytose par les macrophages. Une fois que l'ensemble des bactéries est éliminé, un certain nombre de processus permettent la réparation tissulaire, étape importante afin que l'intégrité de l'épithélium soit retrouvée et sa protection restaurée.

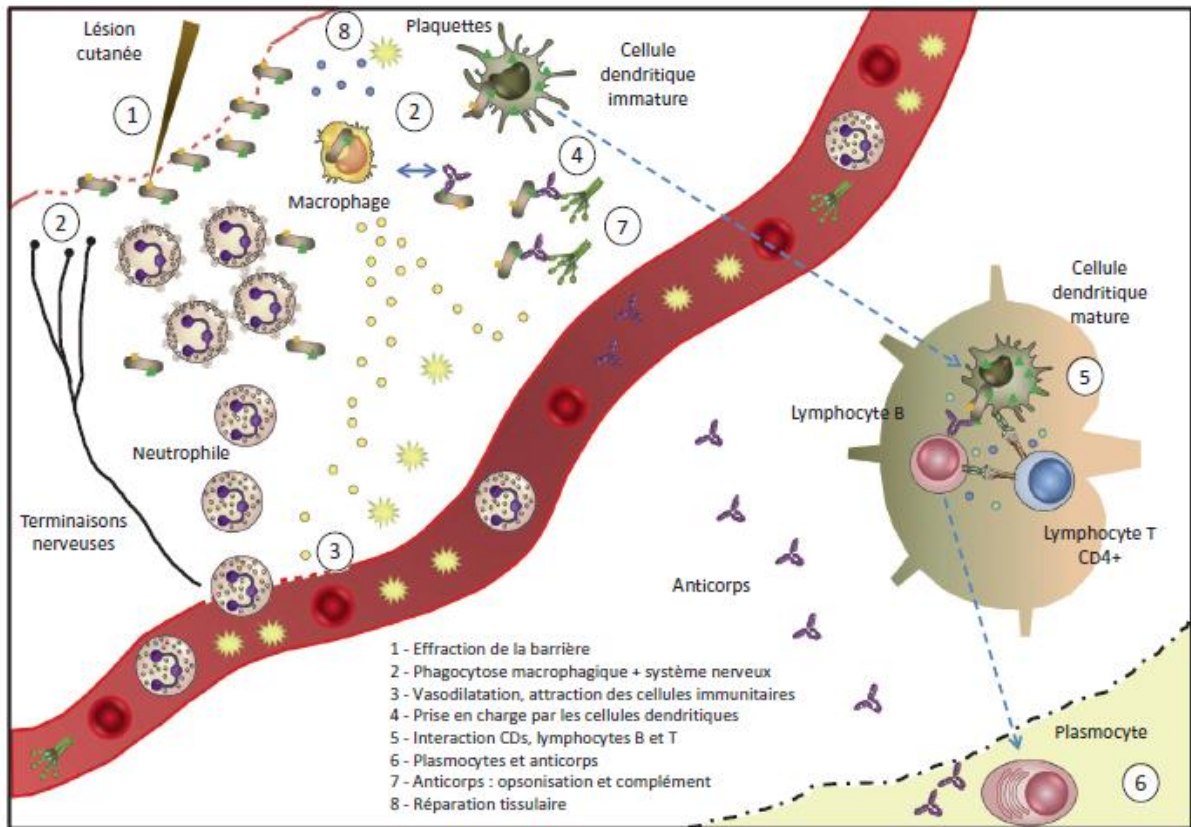


Figure 1.5. Le système immunitaire en action

Chapitre 2 : Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH et HLA)

Le système HLA (*Human Leucocyte Antigen*) a un rôle dans la réponse immunitaire, via la présentation des antigènes aux lymphocytes T (LT). L'extrême diversité (polymorphisme génétique) du CMH en fait également le déterminant principal de l'acceptation (histocompatibilité) ou du rejet des greffes entre donneur et receveur différents, ce qui fut à l'origine de sa découverte par Jean Dausset et de sa dénomination.

Le CMH humain est dénommé HLA (*Human Leukocyte Antigen*) car la première molécule d'histocompatibilité identifiée avait été repérée comme un antigène leucocytaire.

1. Le complexe HLA

Il est situé sur le brin court du chromosome 6 (Breuning et al., 1977; Francke and Pellegrino, 1977), plus précisément, sur la position 6p21.3 (Morton et al., 1984) (**Figure 2.1**). Le séquençage complet de la région du système HLA a été effectué en 1999 (The MHC sequencing Consortium, 1999), En même temps que le séquençage complet du génome humain. Cette région qui s'étend sur environ 4 mégabases (Mb) comprend plus de 200 gènes exprimés, dont environ 10 à 20% sont liés à des fonctions immunitaires. Il s'agit de la région la plus polymorphe du génome humain, et ses variations génétiques sont associées à diverses maladies auto-immunes (Trowsdale, 2011).

2. Organisation génomique de la région HLA

Les molécules HLA sont étroitement liées et sont regroupées en trois groupes de gènes nommées HLA classe I, HLA classe II et HLA classe III selon leurs positions et fonctions (**Figure 2.1**).

2.1. Le HLA de classe I

Il comprend des gènes appelés HLA classiques regroupant trois loci : HLA-A, HLA-B et HLA-C, dont chacun code pour la chaîne lourde (chaîne α) de la molécule correspondante de classe I. Ces molécules sont très polymorphes. Ce sont des glycoprotéines exprimées par

toutes les cellules nucléées. Quelques pseudogènes HLA-H, -J, -K et -L se retrouvent aussi dans cette région, mais ne codent cependant aucun gène.

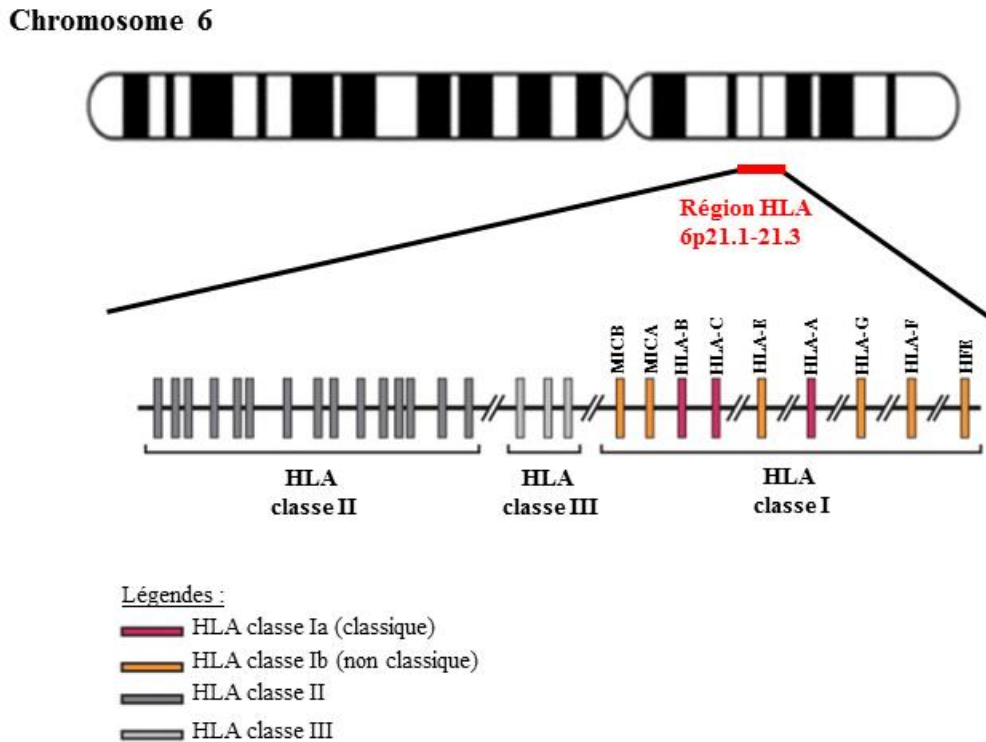


Figure 2.1. Organisation génomique de la région HLA. Adapté de (Elmer and McAllister, 2012).

2.2. Le HLA de classe II

Il code pour les deux chaînes (chaînes α et β , de taille similaire). Le locus regroupe trois paires de gènes HLA de classe II classiques, HLA-DP (gènes DPA et DPB), HLA-DQ (DQA et DQB) et HLA-DR (DRA et DRB1). Leur expression est limitée aux lymphocytes B (LB), aux macrophages et aux cellules dendritiques (CD).

2.3. Le HLA de classe III

Entre les locus de classe I et de classe II, il existe également divers gènes qui ne codent pas pour des molécules HLA, mais beaucoup d'entre eux sont liés à l'immunité. Il s'agit de HLA de classe III, situé entre le HLA classe I et classe II, et qui contient des gènes codants

pour des protéines du système du complément (C2, C4, facteur B), ainsi que des gènes codants pour le TNF, molécules essentielles dans l'immunité innée.

2.4. Les HLA de classe I non classiques

Par ailleurs, il existe aussi des molécules HLA de classe I non classiques, qui sont appelées molécules HLA de classe Ib. Elles ont une structure remarquablement similaire aux molécules de la classe Ia mais représentent un polymorphisme très limité, une expression tissulaire plus restreinte et peuvent être impliquées dans certaines étapes de la réponse immunitaire. Parmi ces molécules, le HLA-E, -F et -G, MICA et MICB, les HLA-E, -F et -G ont des fonctions différentes et sont exprimées dans différents types de cellules (Braud et al., 1998) ; (Borrego et al., 1998). Il existe d'autres molécules comme : la molécule HFE (ou HLA-H) qui est une protéine associée à la β_2 -microglobuline et qui joue un rôle dans la régulation de l'absorption du fer ; FcRn (*neonatal Fc receptor*) ; ZAG (*Zinc α -glycoprotein*) ; MR1 et CD1d cependant peu décrites à ce jour.

3. Les caractéristiques génétiques de gènes HLA classiques

3.1. Caractéristiques génétiques communes aux deux classes

3.1.1. Polymorphisme génétique multiallélique:

Le CMH est l'un des complexes génétiques les plus polymorphes connus chez l'homme. Il existe dans l'espèce humaine un très grand nombre d'allèles pour chaque gène HLA classique (plusieurs centaines pour la plupart d'entre eux) (**Tableau 2.1**). Par conséquent, les produits de gènes exprimés par les différents individus ont des différences structurales spécifiques.

Chaque individu est hétérozygote pour la plupart de ses gènes HLA de classe I et de classe II, et n'exprime qu'un ou deux des allèles de chaque gène présents dans l'espèce humaine. Cette caractéristique rend chaque individu quasiment unique.

Tableau 2.1. Tableau représentatif des allèles de HLA classe I et II, figurant actuellement sur la database IGMT/HLA (Avril 2021).

Gène	Nombre d'allèles
HLA classe I	21040
HLA classe II	7898
HLA classe I	
HLA-A	6425
HLA-B	7754
HLA-C	6329
HLA classe II	
HLA-DRA	29
HLA-DRB	3621
HLA-DQA1	279
HLA-DPA1	233

3.1.2. Polymorphisme de la protéine correspondante (allotype HLA)

Chaque allèle code pour une protéine caractérisée par un ou plusieurs acides aminés variants comparée aux protéines codées par d'autres allèles.

3.1.2.1. Codominance et transmission en bloc

Chez un individu donné, pour chaque gène, l'hétérozygotie se traduit par l'expression des deux allotypes portés chacun par un chromosome 6. L'ensemble des gènes HLA (haplotype HLA) de l'un des chromosomes 6 paternels et de l'un des chromosomes 6 maternels est donc transmis aux enfants. Au sein d'une famille, la probabilité d'une identité HLA entre frères ou sœurs est ainsi d'une chance sur quatre. Pour la même raison, il y a un

déséquilibre de liaison entre les allèles de gènes HLA différents par exemple, dans la population caucasienne HLA-A1 coexiste très souvent avec HLA-B8 et HLA-DR3. Ceci signifie que la probabilité de trouver associés deux allèles particuliers est supérieure au simple hasard.

4. Nomenclature

La nomenclature des gènes HLA classiques est très précise et harmonisée au niveau international. Les techniques initiales de typage HLA (typage sérologique) ont permis d'identifier des familles d'allotypes désignées par le nom du gène et un numéro (par exemple HLA-A1, HLA-B27, HLA-DR3 ...). La nomenclature inclut le nom du gène, suivi des numéros de la famille allélique et de l'allèle dans cette famille (séparés par * et :). Exemple : HLA-A*02:101 (Figure 2.2).

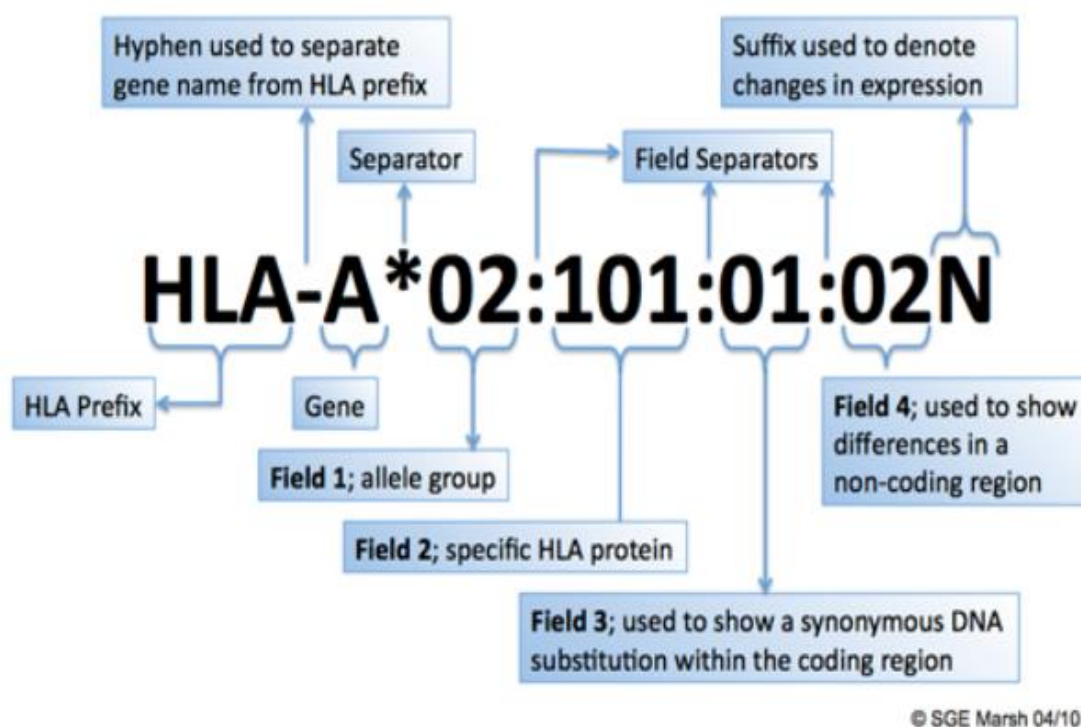


Figure 2.2. Exemple de nomenclature du gène HLA. Selon *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* (Avril 2011).

5. Expression des gènes CMH

5.1. Expression des gènes CMH de classe I

La majorité des cellules nucléées expriment des molécules CMH de classe I. Leur densité varie selon le type cellulaire. On observe une forte densité (10^5 par cellule) sur les lymphocytes, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, une densité intermédiaire (10^4) sur les cellules épithéliales et endothéliales, une densité faible voire nulle sur les cellules du pancréas, des glandes salivaires, les hépatocytes, la cornée, les hématies. La densité d'expression peut augmenter dans un contexte inflammatoire.

Aussi, les HLA de classe I sont présents sous forme soluble dans les liquides biologiques.

5.2. Expression des gènes CMH de classe II

L'expression des molécules CMH de classe II est limitée à l'état basal aux cellules présentatrices d'antigène professionnelles: cellules dendritiques, monocytes/macrophages et lymphocytes B. L'activation de ces cellules augmente la densité d'expression des molécules CMH II à leur surface.

Les lymphocytes T quiescents n'expriment pas les molécules CMH de classe II. Leur expression est induite par l'activation de ces cellules.

Les cellules épithéliales et endothéliales n'expriment pas les molécules CMH de classe II à l'état basal, mais peuvent les exprimer dans un contexte inflammatoire.

5.3. Présentation des antigènes

Les lymphocytes T caractérisés par l'expression des molécules CD8 sont susceptibles de répondre aux antigènes présentés par les molécules CMH de classe I. L'expression ubiquitaire de ces dernières permet aux mécanismes effecteurs de l'immunité dépendant des lymphocytes T CD8 de s'exercer vis-à-vis de la quasi-totalité des cellules nucléées.

Les lymphocytes T qui expriment les molécules CD4 sont susceptibles de répondre aux antigènes présentés par les molécules CMH de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigène. On parle de restriction de classe I ou de classe II de la reconnaissance au contexte CMH.

5.4. Les produits des gènes CMH

Les molécules CMH sont des glycoprotéines de membrane. Les produits des gènes de classe I ou de classe II ont la même structure générale. Ce sont des hétérodimères dont les chaînes α et β s'apparient de manière non covalente (**Figure 2.3**).

La partie extracellulaire de l'hétérodimère expose deux domaines proximaux (proches de la membrane cellulaire) conformés selon le modèle «domaine immunoglobulinique» et deux domaines distaux de structure originale comportant chacun une plage de feuillets β plissés surmontée d'une hélice α .

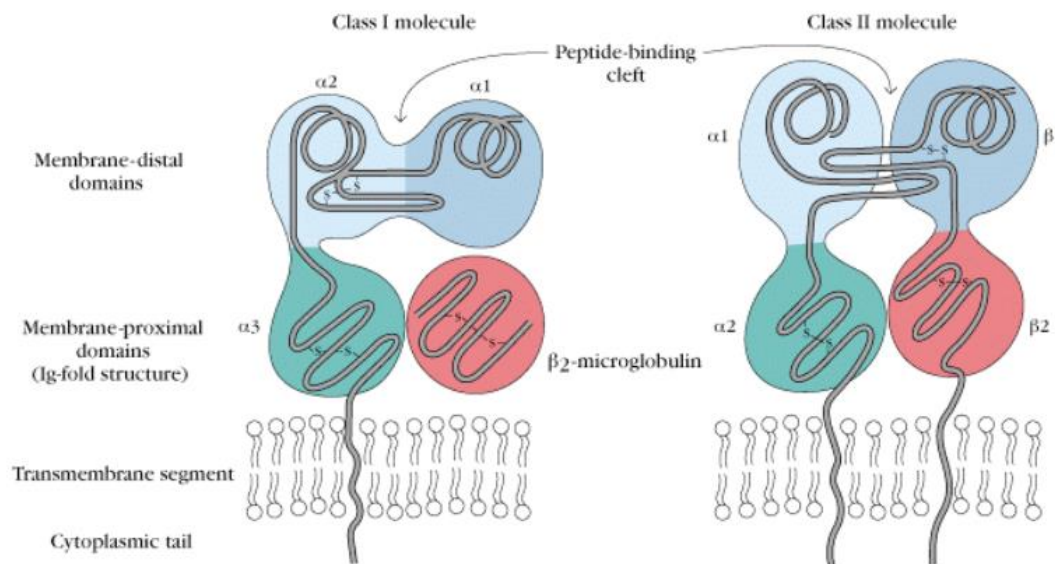


Figure 2.3. Structure moléculaire des molécules de classe I et de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). HLA de classe I, de classe II et la β 2-microglobuline (en rouge), appartiennent à la superfamille des immunoglobulines pour leurs domaines proximaux (proches de la membrane phospholipidique) comme l'indique la présence de feuillets β plissés. Par contre, les sillons de présentation ont une structure particulière avec un fond de feuillets β -plissés et des hélices α .

L'appariement des deux domaines distaux délimite un sillon médian, ou sillon de présentation, dans lequel peut s'enchâsser un peptide. Cette fixation s'opère selon le modèle « clé-serrure », ce qui exige une complémentarité suffisante entre la forme et les caractéristiques physicochimiques du sillon et celles du peptide. Le sillon a pour vocation de contenir un peptide dont 2 à 4 acides aminés doivent se nicher dans des « poches d'ancrage » au fond du

sillon, ce qui n'est possible que si les acides aminés d'ancrage du peptide ont des caractéristiques physicochimiques adéquates.

Le peptide est retenu par des liaisons non covalentes étagées sur toute la longueur du sillon, ce qui stabilise la molécule HLA. L'enchâssement du peptide est une nécessité pour que la molécule HLA puisse s'exprimer à la surface de la cellule.

Chaque gène CMH de classe I code pour une chaîne alpha, ancrée dans la membrane, qui possède trois domaines extracellulaires. Son domaine proximal $\alpha 3$ s'apparie à la $\beta 2$ -microglobuline qui est une protéine invariante formant un domaine immunoglobulinique, codée par un gène qui n'appartient pas au complexe génique HLA. Les domaines distaux $\alpha 1$ et $\alpha 2$ délimitent le sillon de présentation. Les extrémités des hélices alpha de ces domaines sont rapprochées, ce qui ferme le sillon. Le peptide enchâssé est donc de petite taille, en moyenne 9 acides aminés, car ses deux extrémités sont bloquées dans le sillon.

Chaque paire de gènes CMH de classe II code pour deux chaînes, une chaîne alpha et une chaîne β , toutes deux ancrées dans la membrane, comportant chacune deux domaines extracellulaires. L'appariement des domaines distaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ délimite le sillon de présentation. Les extrémités de leurs hélices alpha sont moins rapprochées que dans le cas de la classe I et le sillon de présentation est ouvert. Le peptide peut déborder et donc être plus long, entre 12 et 25 acides aminés. Sa partie médiane satisfait aux contraintes d'ancrage.

Si l'on considère l'ensemble des molécules HLA codées par le même allèle, on constate que des peptides de séquence différente peuvent s'y enchâsser, pourvu qu'ils respectent les conditions de taille et les critères d'ancrage. A la surface de la cellule, l'ensemble des molécules HLA d'un allotype donné présente ainsi une collection de peptides. L'origine de ces peptides diffère selon qu'il s'agit de molécules de classe I ou de classe II.

6. Formation des complexes CMH-peptides

L'expression à la surface des cellules des molécules de classe I et de classe II est subordonnée à l'enchâssement d'un peptide: il n'y a pratiquement pas de molécules CMH «vides» à la surface des cellules.

L'apprêtement des antigènes correspond à l'ensemble des étapes préalables à l'enchâssement d'un peptide. Les peptides issus de la fragmentation des protéines intracellulaires sont

présentés très rapidement, ce qui permet aux lymphocytes T d'exercer presque en temps réel la surveillance de toute modification du *non soi*.

L'approvisionnement des molécules du CMH en peptides tire parti des processus normaux du catabolisme cellulaire, différents selon qu'il s'agit de protéines endogènes (synthétisées par la cellule elle-même) ou exogènes (ingérées à partir du milieu extracellulaire). Ces processus sont complétés par l'intervention de molécules spécialisées (enzymes, transporteurs protéiques), qui pour certaines sont codées par des gènes (invariants ou très peu variants) localisés dans la région II du CMH.

L'origine des peptides présentés dépend de la classe du CMH, avec des particularités notables dans le cas des cellules dendritiques.

6.1. Les molécules de classe I présentent des fragments de protéines endogènes

Les molécules présentées sont des protéines synthétisées dans le cytosol, protéines du *soi* ou défectueuses (protéines qui n'acquièrent pas leur conformation correcte de la biosynthèse). La cellule traite de la même façon les protéines codées par son propre génome et les protéines *non soi* qui peuvent être présentes dans le cytosol après transformation maligne ou parce qu'elles sont codées par un génome viral. On distingue 3 étapes dans l'apprêtement :

- Fragmentation : après "étiquetage" des protéines à éliminer par la fixation d'ubiquitine, elles sont dégradées par le protéasome, tunnel multi-enzymatique qui assure la dégradation de protéines en libérant des peptides de longueur variable.
- Translocation des peptides issus du protéasome vers le réticulum endoplasmique : la très grande majorité des peptides sera totalement dégradée, mais environ 1‰ sont injectés dans le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*).
- L'un des peptides injectés dans le réticulum pourra alors s'enchâsser dans le sillon béant d'une molécule de classe I en cours de formation, la stabiliser et permettre son acheminement vers la surface de la cellule.

L'extrémité N-terminale des peptides trop longs pour s'enchâsser peut éventuellement être raccourcie par des peptidases présentes dans le cytosol ou le réticulum endoplasmique.

Les cytokines proinflammatoires, en particulier l'interféron- γ , améliorent l'efficacité du processus d'apprêtement, notamment en induisant la formation de l'immunoprotéasome.

Dans cet organite, les protéases du protéasome sont remplacées par des protéases spécialisées aboutissant à un meilleur respect des exigences d'enchâssement de l'extrémité

C-terminale du peptide.

L'ensemble des peptides enchâssés par les diverses molécules de classe I exprimées à la surface de la cellule constitue donc un échantillon des protéines endogènes normales ou du « *non soi* ». Cette particularité permet d'éviter que les mécanismes effecteurs de l'immunité adaptative n'entraînent des dommages collatéraux : une cellule qui réalise une protéosynthèse anormale sera correctement repérée par les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs, mais une cellule saine voisine (« *innocent bystander* ») ne risque pas d'être lésée.

6.2. Les molécules de classe II présentent des protéines exogènes

Dès sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, l'hétérodimère CMH de classe II s'associe à la protéine invariante Ii. La chaîne Ii s'enroule (comme le serpent d'un caducée) autour de l'hétérodimère, avec deux conséquences importantes :

- elle obstrue le sillon de présentation, ce qui empêche la capture d'un peptide présent dans le réticulum endoplasmique
- elle déroute le complexe [hétérodimère de classe II + Ii] vers les vésicules intracytoplasmiques composant l'endosome. L'endosome est un compartiment subcellulaire comprenant des vésicules d'acidité croissante qui assure le recyclage des membranes de la cellule (processus normal et permanent ; il s'agit donc de protéines endogènes du « *soi* »), l'ingestion de protéines exogènes et la fusion avec les lysosomes, qui apportent des protéases actives à pH acide.

La conjonction du transport du complexe [classe II + Ii] vers une vésicule de l'endosome permet aux protéases lysosomiales de fragmenter les protéines captées dans la vésicule et de rogner progressivement la chaîne Ii.

Un peptide intralysosomal, dérivé des protéines dégradées peut alors s'enchâsser, ce qui permet à la molécule de classe II chargée en peptide de gagner la membrane plasmique.

Les molécules de classe II présentent donc en surface un échantillon « mixte », issu des protéines transmembranaires du « *soi* » recyclées et des protéines exogènes. Cet échantillonnage est le reflet du microenvironnement de la cellule.

Il existe une exception à cette présentation des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe II. En effet, comme les autres cellules nucléées, les cellules dendritiques portent des molécules CMH de classe I. Quand elles sont stimulées, elles peuvent exposer à leur surface des molécules de classe I qui ont la particularité d'enchâsser des peptides dérivés de protéines exogènes. On parle de présentation croisée.

Par ailleurs, certaines toxines bactériennes, appelées super antigènes, sont capables d'établir directement (sans apprêtement) un pontage entre une molécule HLA de classe II et divers lymphocytes T. Ces super antigènes se fixent à une région non polymorphique de la molécule CMH et à une région V β adéquate, partagée par de nombreux lymphocytes T (plus de 1%) quelle que soit leur spécificité. Ce pontage a comme conséquence l'activation polyclonale de ces lymphocytes T générant une réponse inflammatoire importante.

6.3. Reconnaissance des molécules CMH à la surface de la cellule par les lymphocytes T

A l'étape de reconnaissance de l'antigène, les lymphocytes T examinent la surface de la cellule présentatrice. Quand des molécules HLA présentent un peptide qui correspond à la spécificité de l'immunorécepteur du lymphocyte T, le signal d'activation s'amorce. Dans le cas contraire, le lymphocyte T s'éloigne et reste quiescent.

Au niveau moléculaire, un complexe ternaire se forme dans lequel le peptide antigénique est en « sandwich » entre la molécule HLA et le TCR $\alpha\beta$. Le paratope du TCR $\alpha\beta$ est alors en contact avec :

- d'une part, les acides aminés du peptide accessibles entre les berges du sillon
- d'autre part, plusieurs acides aminés des hélices alpha qui bordent le sillon de la molécule HLA classique.

Le TCR $\alpha\beta$ reconnaît ainsi un « ligand composite » dans lequel :

- environ un tiers des acides aminés (2 à 4) sont ceux du peptide antigénique
- deux tiers sont des acides aminés des deux hélices du CMH

En raison du polymorphisme du CMH, et à partir d'une protéine donnée, chaque allotype HLA présente des peptides conformes à ses contraintes d'ancrage et comporte lui-même des acides aminés variants par rapport aux autres allotypes. La même protéine sera donc reconnue différemment par les lymphocytes T de deux individus distincts.

Le processus d'activation du lymphocyte T commence ainsi par un signal cognitif, initié par l'interaction du TCR $\alpha\beta$ avec son peptide antigénique enchâssé dans la molécule CMH. Il nécessite l'implication d'un « co-récepteur » (CD4 ou CD8 selon la population lymphocytaire T considérée) qui interagit avec la molécule HLA :

- la molécule CD4 se lie au domaine proximal non polymorphique d'une molécule de classe II.

- la molécule CD8 se lie au domaine proximal $\alpha 3$, non polymorphique d'une molécule de classe I.

Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent répondre face à des cellules qui expriment des molécules de classe II et les lymphocytes T CD8⁺ peuvent répondre face à toute cellule qui exprime des molécules de classe I.

Comme mentionné plus haut, selon le génotype de chaque individu, le CMH définit un ensemble de peptides, un «répertoire de peptides», capables de s'enchâsser dans au moins une de ses molécules. Ce répertoire individuel conditionne des différences interindividuelles de réponse immunitaire adaptative vis-à-vis de certains antigènes. On parle de sujets bon ou mauvais répondeurs. A l'extrême, certains individus s'avèrent incapables de répondre efficacement à un antigène donné, avec des conséquences sur l'immunité anti-infectieuse et l'efficacité de certains vaccins.

L'hétérozygotie constitue un avantage, car le nombre de molécules CMH exprimées à la surface des cellules, l'existence de plusieurs gènes dans chaque classe et leur allotypie multiplient les chances pour un peptide donné de pouvoir s'enchâsser, donc de pouvoir induire une réponse immunitaire adaptative chez un individu donné. Comparés aux homozygotes, les sujets hétérozygotes ont un répertoire plus vaste de peptides présentables car ils ont une «double chance» de présentation pour chaque gène CMH exprimé.

En raison des contraintes d'apprêtement et d'enchâssement, une protéine antigénique donnée ne comporte généralement qu'un seul peptide apte à être présenté efficacement au lymphocyte T spécifique (épitope dominant). Pour un même antigène, en fonction du polymorphisme, l'épitope dominant peut cependant être différent selon les individus. Les autres fragments peptidiques, dits sous-dominants ou privés, de l'antigène n'interviennent généralement pas ou peu dans la réponse immunitaire. Ils sont moins bien enchâssables ou plus fragiles quand la protéine est fragmentée, ils sont moins présents à la surface des cellules et sont donc moins aptes à stimuler les lymphocytes correspondants. La majorité des fragments peptidiques issus de l'antigène reste «invisible» pour les lymphocytes T. On parle de peptides cryptiques.

7. Autres molécules HLA et molécules apparentées

Les récepteurs de la famille KIR des cellules NK reconnaissent certaines molécules de classe I classique. La possibilité d'interaction est déterminée par un acide aminé critique à une position précise de l'hélice $\alpha 1$, sans que le peptide enchâssé n'intervienne dans la reconnaissance. Il s'agit:

- de HLA-C, dont les divers allotypes peuvent être répartis en deux sous-groupes (C1 / C2) cibles de la famille KIR2
- d'un sous-groupe d'allotypes de HLA-B, cible de la famille KIR3
- et de quelques allotypes de HLA-A

7.1. Reconnaissance des molécules apparentées au HLA

Les molécules de classe I non classiques de type HLA-E s'expriment principalement en cas de stress et peuvent alors être reconnues par certains récepteurs des cellules NK. De même, les molécules HLA-G jouent un rôle lors de la grossesse. Elles sont exprimées par le placenta ce qui leur permet de contrôler les cellules NK qui envahissent l'utérus gravide. Elles ont également un rôle dans l'immunité anti-cancéreuse.

Les molécules MICA ou MICB sont reconnues par certains récepteurs de cellules NK ou de lymphocytes T non conventionnels. Leur expression sur les épithéliums est induite par le stress et elles jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité de ces structures.

Les molécules CD1 ont une structure apparentée aux molécules HLA, mais leurs gènes sont localisés sur un autre chromosome. Elles présentent des antigènes non protéiques à des lymphocytes T non conventionnels, à l'interface de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

Chapitre 3: Les immunoglobulines

1. Les immunoglobulines

Les anticorps forment dans leur ensemble une famille de protéines plasmatiques connues sous le nom d'immunoglobulines. Ces derniers tirent leur nom de la découverte qu'elles migrent avec les protéines globulaire lorsqu'un sérum immun (contenant des anticorps) est placé dans un champ électrique (**Figure 3.1**).

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines, produites par les plasmocytes (cellules au stade final de différenciation des LB). Elles sont porteuses de l'activité d'anticorps. Ce sont des effecteurs solubles de l'immunité humorale spécifique d'antigène. Elles constituent une super famille de glycoprotéines solubles impliquées dans la reconnaissance et la fixation d'antigènes ou l'adhésion entre cellules.

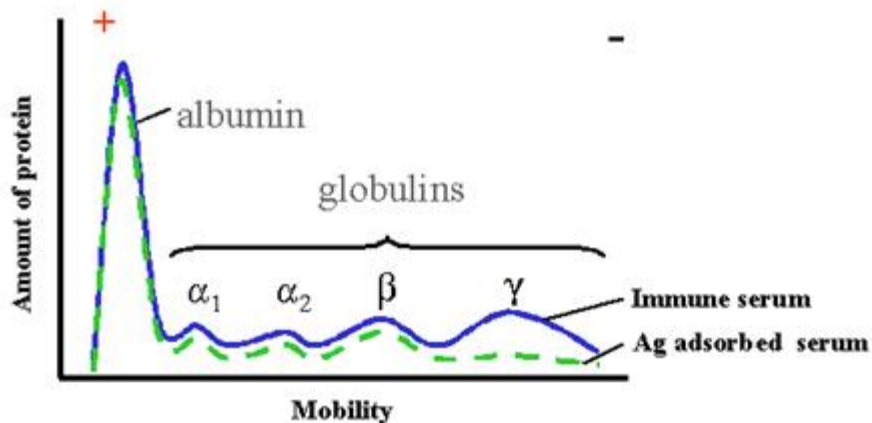


Figure 3.1. Séparation électrophorétique des protéines du sérum

2. Structure générale d'une molécule d'immunoglobuline

2.1. Rappel historique

Tableau 3.1. Tableau représentatif de quelques dates clés de la découverte des immunoglobulines.

1890	Découvert des substances dans le sérum qui neutralisent les toxines diphtériques (antitoxines)	Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1901
1900	Hypothèse de la formation d'Acs	Prix Nobel de en 1908
1938	Hypothèse de la fixation d'un Acs à un antigène	
1948	Découverte de la production des Acs par les LB	
1972	Travaux sur la structure chimique des Acs	Prix Nobel de en 1972
1984	Travaux sur les Acs monoclonaux	Prix Nobel de en 1984

2.2. Structures du système des immunoglobulines

Les Ig sont des molécules symétriques formées de 4 chaînes polypeptidiques homologues : 2 chaînes lourdes (H pour *heavy*) et de deux chaînes légères (L pour *light*)

Les chaînes H sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures (**Figure 3.2**).

Les chaînes L sont unies aux chaînes H par un pont disulfure très proche de leur extrémité constante et carboxy (C)-terminale.

Ig sont parmi les protéines dont on connaît le mieux la structure ce sont des protéines très flexibles.

2.2.1. Les chaînes lourdes

Il existe cinq types de chaînes lourdes, désignées par les lettres grecques γ (gamma), α (alpha), μ (mu), δ (delta), et ϵ (epsilon) qui définissent les cinq classes d'immunoglobulines,

respectivement IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE. Certaines classes sont divisées en sous-classes comme pour les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2).

2.2.2. Les chaînes légères

Il existe deux types de chaînes légères, appelées κ (kappa) et λ (lambda) qui peuvent se combiner avec n'importe quel type de chaîne lourde. Pour une immunoglobuline donnée, les deux chaînes légères sont toujours identiques.

Le rapport entre les anticorps porteurs de chaînes légères κ et λ varie d'une espèce à l'autre, ce rapport est de 2/1 chez l'homme pour les IgG.

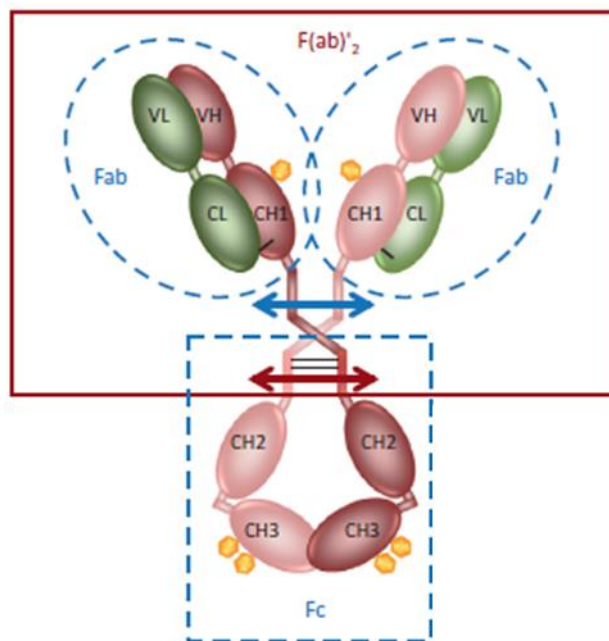


Figure 3.2. Exemple monomère d'IgG1. L'IgG1 comporte : Deux chaînes lourdes (H) identiques entre elles (en rouge) comportant : 3 domaines constants (CH) et un domaine variable (VH). Deux chaînes légères (L) identiques entre elles (en vert), comportant : un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL).

2.3. Sensibilité enzymatique de la molécule des immunoglobulines

La digestion par la papaine (en bleu) clive l'Ig en : deux fragments Fab (*Fragment antibody*) et un fragment Fc (*Fragment cristallisable*) (Figure 3.2). La digestion par la pepsine, donne un fragment F(ab')₂ (en rose).

3. Génétique Moléculaire et diversité des Immunoglobulines

Pour répondre à un grand nombre d'antigène, le système immunitaire doit avoir un répertoire de BCR varié. L'organisme a de ce fait mis en place un certain nombre de mécanisme afin d'augmenter la diversité des immunoglobulines. Suivant le mécanisme responsable utilisé, on compte 5 niveaux de diversité :

- La diversité combinatoire relative à la recombinaison VDJ et due à des associations aléatoires des différents gènes V, gènes D et gènes J.
- La diversité jonctionnelle due à des mécanismes d'additions et de délétions aléatoires au niveau des extrémités des gènes V, gènes D et gènes J avant fusion lors de la recombinaison VDJ. On rappelle que ce mécanisme est surtout présent au niveau de la chaîne lourde.
- La diversité « H-L » obtenue par une association au hasard des chaînes lourdes et légères.
- L'hypermutation somatique due à une augmentation de mutations ponctuelles au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères.
- La commutation de classe due à des changements de régions constantes.

3.1. Commutation de classe

Commutation de classe ou CSR (pour « *Class Switch Recombinaison* ») sert au remplacement du locus C_{μ} par un autre locus, afin d'exprimer une immunoglobuline d'un autre isotype qui aura un rôle bien déterminé au sein de l'organisme. En effet le choix de l'isotype se fait suivant la réponse immunitaire voulue.

Ce mécanisme correspond à un réarrangement irréversible de l'ADN, et ceci par excision des séquences d'ADN situé entre le gène J et le gène codant pour la chaîne lourde voulue. Ceci est possible par la présence de séquences caractéristiques appelées régions S (pour régions Switch) en amont de chaque gène, entraînant le rapprochement des séquences codantes pour l'IgM et l'Ig voulue, puis l'excision de toutes les séquences d'ADN situées entre ces deux régions Switch

4. Spécificités antigéniques des immunoglobulines

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire et de structure complexe. Ce sont donc d'excellents antigènes; Et comme tout antigène, ils possèdent des déterminants antigéniques répartis en trois types :

4.1. Déterminants isotypiques

Les déterminants isotypiques sont présents chez tous les individus d'une même espèce. Ils correspondent aux motifs définissant les classes et sous-classes des Ig, ainsi que, les types et les sous types de chaînes légères.

Les déterminant isotypiques sont portés par les domaines constants des chaînes lourdes et légères. Il existe : 9 isotypes différents pour les chaînes lourdes permettant de distinguer :

- 5 classes d'Ig : IgG, IgA, IgM, IgE, IgD
- 4 sous classes d'IgG : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
- 2 sous classes d'IgA : IgA1, IgA2

4.2. Déterminants allotypiques

Les déterminants allotypiques sont propres à un groupe d'individus au sein d'une même espèce. Ils sont représentés par des marqueurs ponctuels situés sur les parties constantes des chaînes γ , des chaînes α et des chaînes κ .

La variation allotypique concerne quelques acides aminés, rend compte de variations génétiques (polymorphisme) à l'intérieur d'une même espèce

4.3. Déterminants idiotypiques

Les déterminants idiotypiques sont des spécificités individuelles de chaque immunoglobuline reflétant la séquence et la conformation des régions variables des chaînes lourdes et légères. Ils confèrent une antigénicité à chaque fois différente qui caractérise un anticorps donné chez un individu.

4. Fonction des immunoglobulines

L'immunoglobuline présente une dualité structurale qui explique sa dualité fonctionnelle. La molécule d'immunoglobuline a deux fonctions distinctes : la première est de se fixer spécifiquement sur des molécules du pathogène qui a induit la réponse immunitaire ; la seconde est de recruter des cellules ou des molécules capables de détruire le pathogène contre lequel elle est dirigée. Ces fonctions sont structurellement séparées sur la molécule d'immunoglobuline. La partie responsable de la fixation sur l'antigène, dont la structure est extrêmement variable d'une molécule d'immunoglobuline à l'autre, est appelée région variable. Cette variabilité permet à chaque immunoglobuline de reconnaître un antigène particulier. L'ensemble du répertoire d'anticorps d'un individu est assez divers pour permettre la reconnaissance de n'importe quel antigène. La région de la molécule responsable des fonctions effectrices ne varie pas de façon aussi considérable. Cette région est appelée région constante bien qu'en fait elle puisse exister sous cinq formes différentes. Ces cinq formes caractérisent l'isotype de la molécule d'immunoglobuline. Ce sont les isotopes qui sont spécialisés dans l'activation de tel ou tel mécanisme effecteur.

La remarquable diversité des molécules d'anticorps est la conséquence des recombinaisons génétiques des gènes codant les immunoglobulines. Une cellule B ne produit pas d'anticorps tant qu'elle n'a pas été stimulée par un antigène spécifique. L'antigène est reconnu par les immunoglobulines de surface du lymphocyte B. La fixation d'un antigène sur ces récepteurs de surface est une étape indispensable à l'activation des cellules B et à leur différenciation en cellules productrices d'anticorps.

Chapitre 4: Communication et signalisation cellulaire

Pour communiquer entre elles, les cellules de l'immunité mettent en jeu une batterie de signaux chimiques et de récepteurs de surface qui leur sont spécifiques. Ainsi, telle cellule placée dans des conditions précises va synthétiser à partir d'un gène donné une protéine signal et la conduire à la surface de sa membrane pour la sécréter. Cette protéine agira sur une autre cellule en étant captée par un récepteur spécifique que cette autre cellule aura exprimé dans sa membrane. Lorsque cette interaction a lieu, le récepteur déclenche à l'intérieur de cette autre cellule divers événements capables de changer son comportement. Les signaux utilisés par l'immunité sont des sortes d'hormones appelés cytokines, une famille de substances dans laquelle on trouve divers sous-groupes comme les interleukines ou les interférons ainsi que divers facteurs de croissance.

1. La communication cellulaire

La communication cellulaire est indispensable et compliquées à la vie des organismes multicellulaires : les cellules doivent impérativement échanger les informations nécessaires à la coordination de leurs actions. La communication intercellulaire permet d'interpréter la multitude de signaux qu'elles reçoivent des autres cellules pour la coordination de leurs comportement et de la fonction des cellules dans et entre les tissus et ceci jusqu'au niveau de l'organisme.

2. Principes généraux de la signalisation cellulaire

L'information transmise d'une cellule à une autre cellule peut se présenter sous différentes formes, la communication cellulaire commence souvent par la transformation des signaux d'une forme en une autre, ce processus s'appelle transduction du signal (**Figure 4.1**).

Une cellule émettrice d'un signal émet un messenger moléculaire extracellulaire à une cellule réceptrice. Ce dernier peut induire la prolifération cellulaire, la différenciation, la mort cellulaire programmée. Ces signaux peuvent être transmis par deux modes d'action : Communication à distance par l'intermédiaire de molécules sécrétées à la membrane cellulaire, un signal diffusible est sécrété par la cellule émettrice et capté par une cellule cible exprimant un récepteur spécifique. Ou une communication par contacte par l'intermédiaire de

molécules liées permet l'interaction physique entre un récepteur et son ligand exprimées à la surface des cellules. Ces messagers peuvent parcourir de courtes distances et stimuler des cellules très proches de l'origine du message, ou traverser tout l'organisme et stimuler éventuellement des cellules très éloignées de la source.

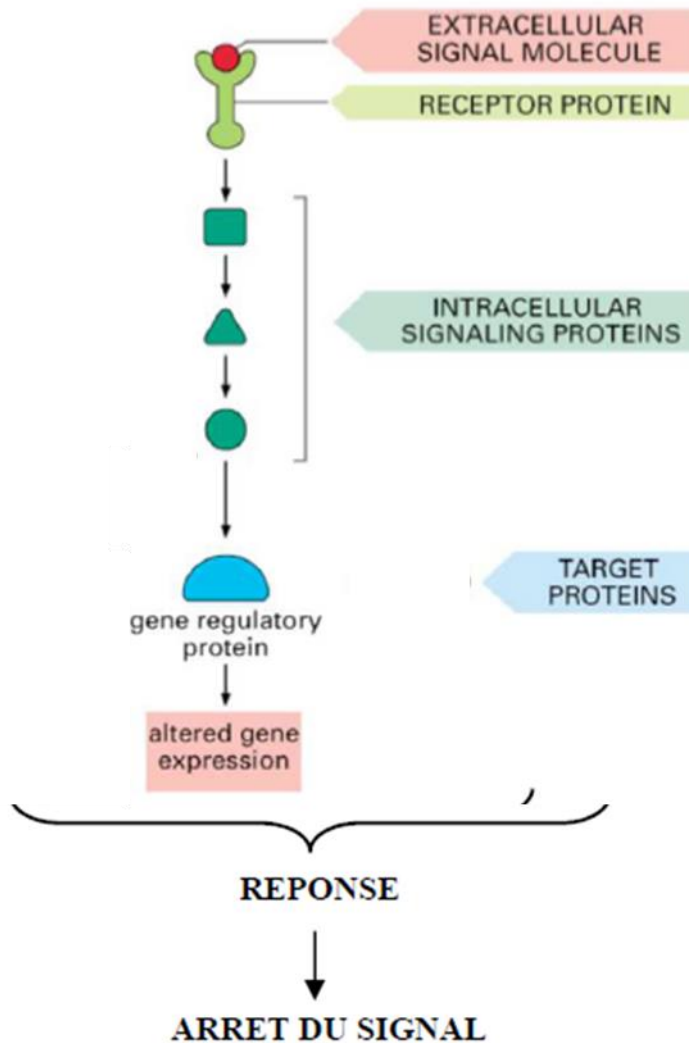


Figure 4.1. Vue générale des voies de transmission permettant aux messagers moléculaire extracellulaires d'induire les réponses intracellulaires.

2.1. Modes de transmission intracellulaire

Les cellules d'un organisme multicellulaire, utilisent des centaines de molécules extracellulaires différentes pour envoyer des signaux les unes aux autres.

2.1.1. PARACRINE

La cellule réceptrice, voisine de la cellule émettrice, reçoit le signal émis par cette dernière (Figure 4.2).

2.1.2. AUTOCRINE

Les cellules peuvent envoyer des signaux à elles-mêmes en excréant dans le milieu intercellulaire, des molécules qui se fixent sur ses propres récepteurs. Exemple : les interleukines (**Figure 4.2**).

2.1.3. ENDOCRINE

La cellule émettrice de l'information, distante de la cellule réceptrice, émet un signal dont la transmission se fait par l'intermédiaire d'une hormone acheminée par le système circulatoire.

2.1.4. JUXTACRINE

Relative à la réception de signaux par une cellule ayant établi un contact physique avec la cellule émettrice ; ces signaux se propagent le long de la membrane cellulaire à travers ses constituants lipidiques ou protéiques et sont susceptibles d'affecter ou bien la cellule émettrice ou bien les cellules adjacentes.

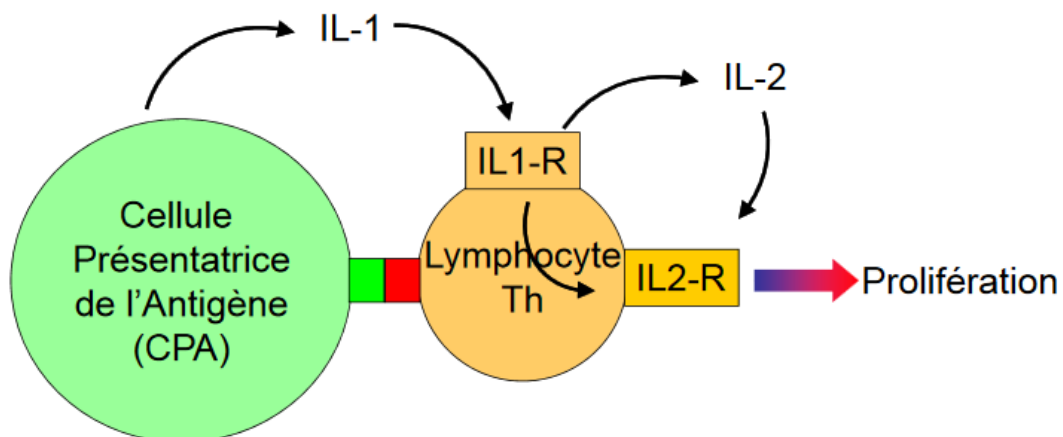


Figure 4.2. Un exemple du système de signaux : autocrine et paracrine. Lors de la reconnaissance des CPA par le LTh, les CPA induisent l'expression de l'IL-1 qui active le récepteur IL-1R exprimé par les LTh (une réponse paracrine). A leur tour les LTh induisent l'expression de l'IL-2 et activent le récepteur IL-2 (phénomène autocrine), induisant ainsi la prolifération cellulaire.

2.2. Les différentes étapes de la signalisation cellulaire

La liaison du ligand sur son récepteur active la transduction du signal (Figure 4.1). Cette communication implique généralement : une molécule de signalisation, un récepteur, des transducteurs intracellulaires du signal et des cibles (targets).

2.2.1. Le devenir d'une cellule dépend de l'intégration de différents signaux

Chaque type cellulaire dispose d'un ensemble de récepteurs qui lui permet de répondre à un ensemble spécifique de molécules de signalisation produits par d'autres cellules. Ces molécules de signalisation fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler le comportement de la cellule. Comme le montre la figure 4.3, les cellules peuvent avoir besoin de plusieurs signaux pour survivre, se multiplier. D'autres signaux pour se différencier. En absence de signaux de survie, la plupart des cellules subissent une mort cellulaire programmée, ou apoptose.

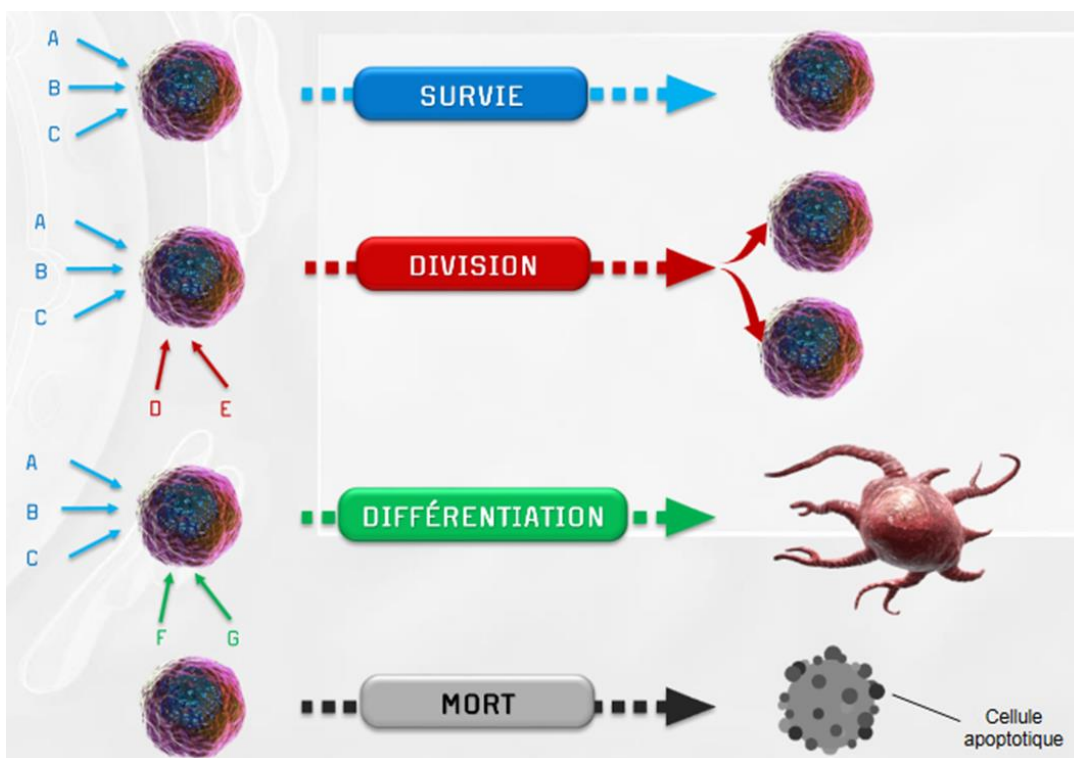


Figure 4.3. Une cellule animale dépend de multiples signaux extracellulaires.

2.2.2. Le réseau de transduction des signaux

La transduction du signal permet à une cellule de répondre et de s'adapter aux stimuli :

- les molécules informatives agissent en combinaison

- Réponse à des séries complexes de stimuli
- Peu de voies sont linéaires, elle contrôle simultanément de nombreux systèmes effecteurs
- Architecture hautement connectée, ce système est robuste

Le réseau de transduction des signaux est complexe et jusqu'à présent il y a plusieurs molécules /voies de signalisation qui ne sont pas encore caractérisés.

3. Signalisation des récepteurs immunologiques

3.1. La signalisation des récepteurs des cytokines

3.1.1. Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire (8 à 70 kDa) produites par de très nombreux types cellulaires. Elles permettent un dialogue entre cellules, régulant des fonctions biologiques extrêmement variées (prolifération, différenciation, activation, survie ou mort cellulaire). Elles sont impliquées dans :

- L'inflammation
- La réponse immunitaire (innée et spécifique)
- L'hématopoïèse

3.1.2. Classification

La famille des cytokines est constituée de différents membres :

- Les interleukines (IL-1 à IL-38), le TNF et les interférons
- Les chimiokines ou chemokines, attirant des cellules (CCL- ou CXCL-)
- Les CSF (Colony Stimulating Factor), jouant un rôle dans l'hématopoïèse

3.1.3. Mode d'action

Les cytokines sont synthétisées par une cellule activée et se lient à des récepteurs membranaires spécifiques. Elles nécessitent d'un contrôle efficace de l'activité biologique des cytokines afin de limiter leurs effets dans le temps et dans l'espace.

Une même cytokine peut être produite par plusieurs types cellulaires. Une même cellule peut produire différentes cytokines. Leur activité comprise entre le nanomole et le picomole.

Ces cytokines vont former un réseau vaste qui sera extrêmement régulé. Elles auront 3 modes d'action possible : Autocrine, paracrine et endocrine (mode d'action rarement utilisé).

3.1.3.1. Pléiotropie

La pléiotropie est le fait que la même cytokine va pouvoir agir sur différents types cellulaires (Figure 4.4).

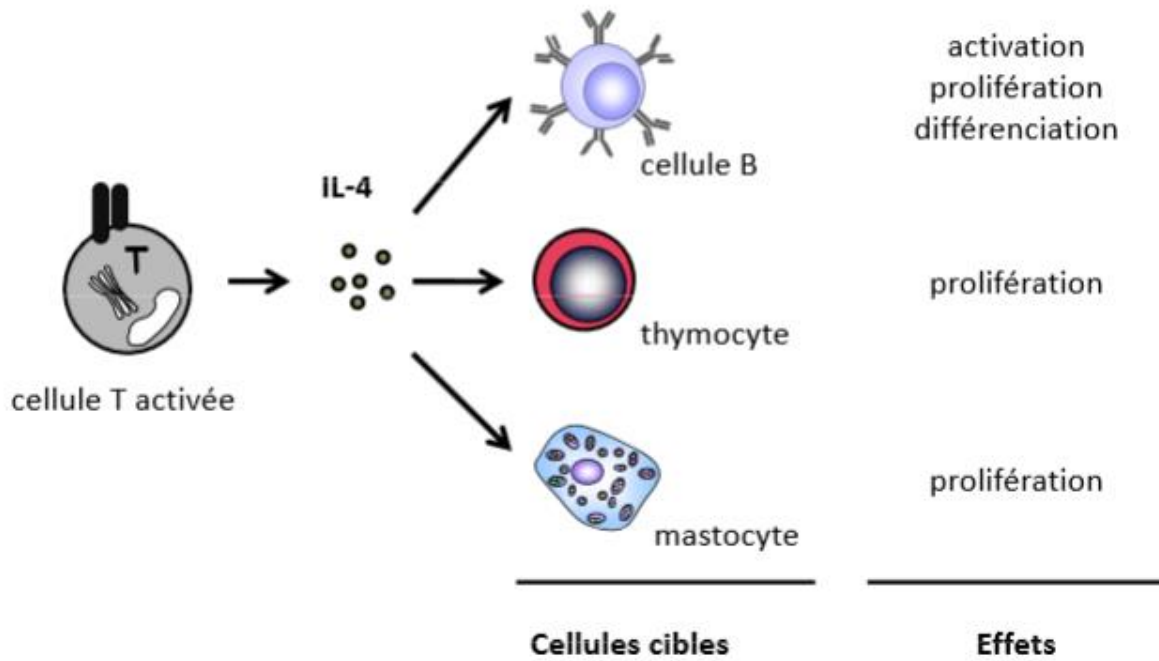


Figure 4.4. Exemple de pléiotropie.

3.1.3.2. Redondance

Les cytokines possèdent un phénomène de redondance, plusieurs cytokines vont avoir le même effet sur un type cellulaire (figure 4.5).

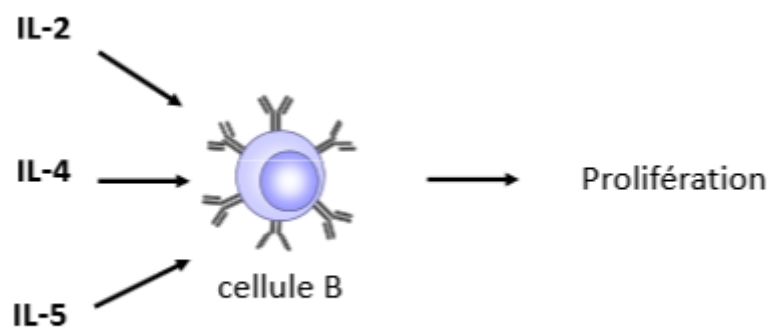
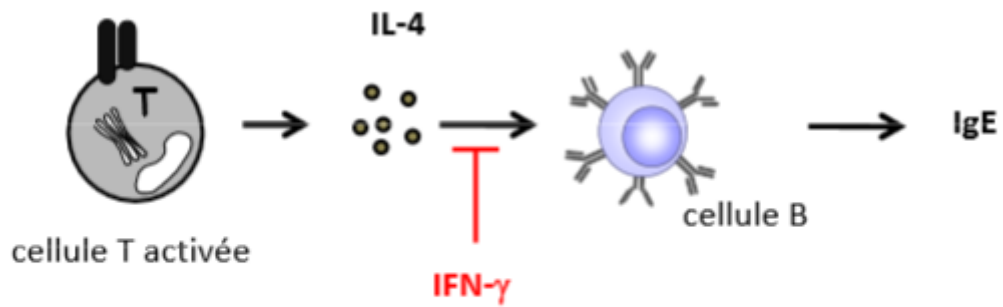


Figure 4.5. Exemple de Redondance.

3.1.3.3. Antagonisme

L'antagonisme est le fait qu'une cytokine inhibe l'action d'une autre cytokine (figure 4.6).



L' IFN- γ inhibe la production d'IgE induite par l'IL-4.

Figure 4.6. Exemple d'antagonisme.

3.1.2.4. Activité en cascade

Une induction de cascade fait intervenir plusieurs cellules sécrétrices de cytokines différentes, afin d'activer différents types cellulaires en cascade, mettant en place une boucle d'activation (Figure 4.7).

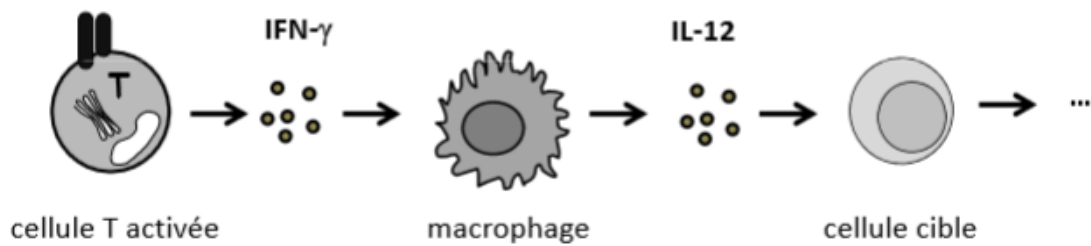


Figure 4.7. Exemple d'activité en cascade.

3.1.2.5. Activité en cascade et en réseau

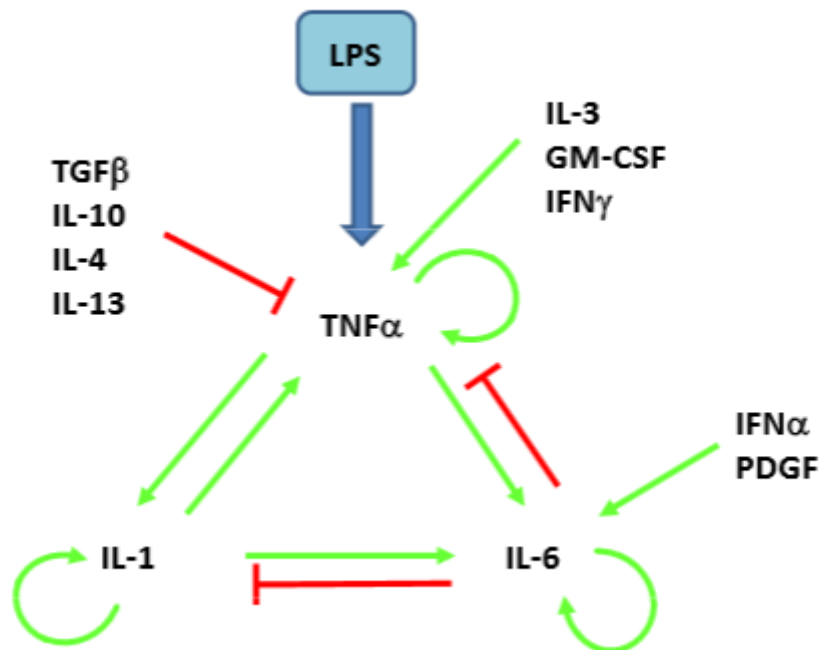


Figure 4.8. Exemple d'activité en cascade et en réseau.

3.1.2.5. Synergie

La synergie est le fait que plusieurs cytokines coopèrent pour induire une signalisation, afin d'avoir un meilleur rendement de signalisation.

3.1.3. Les voies de transduction de signaux

La grande majorité des récepteurs des cytokines sont dépourvus d'activité tyrosine kinase intrinsèque, et pour transduire les signaux émis par la cytokine, ils ont recours au recrutement de tyrosines intra-cellulaires.

- **Les tyrosines de la famille Src:** ex : la p56 lck
- **Les tyrosines de la famille JAK** (*Janus kinase*): comprend 04 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2.

3.1.4. La voie JAK/STAT

C'est la principale voie de transduction emprunté par les récepteurs de type I et II, et donc par la plupart des cytokines. Elle implique les protéines tyrosine kinase JAK ainsi que les facteurs de transcription nucléaires : STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*.)

- Il existe 6 familles de STAT qui ont des actions différentes :

- STAT1 : Gene pro-inflammatoires et pro-apoptotiques.
- STAT2 : Gene anti-inflammatoires de survie, de prolifération.
- STAT3 : Anti-bactériens et anti-viraux.
- STAT4-6 : Survie, différenciation et prolifération.

3.1.5. Fonctionnement de la voie JAK STAT

Les JAK sont structurellement liés à la partie intra-cellulaire des chaînes de récepteurs. La fixation de la cytokine sur son récepteur induit l'oligomérisation des chaînes de récepteur et le rapprochement des JAK qui vont s'autophosphoryler, Ceci va permettre le recrutement des STAT qui vont se fixer sur les résidus tyrosines phosphorylés et vont à leur tour être phosphorylés.

Les STAT phosphorylés se dimérisent et migrent vers le noyau où ils vont se fixer sur des séquences consensus et activer la transcription des gènes responsables de l'activité biologique de la cytokine.

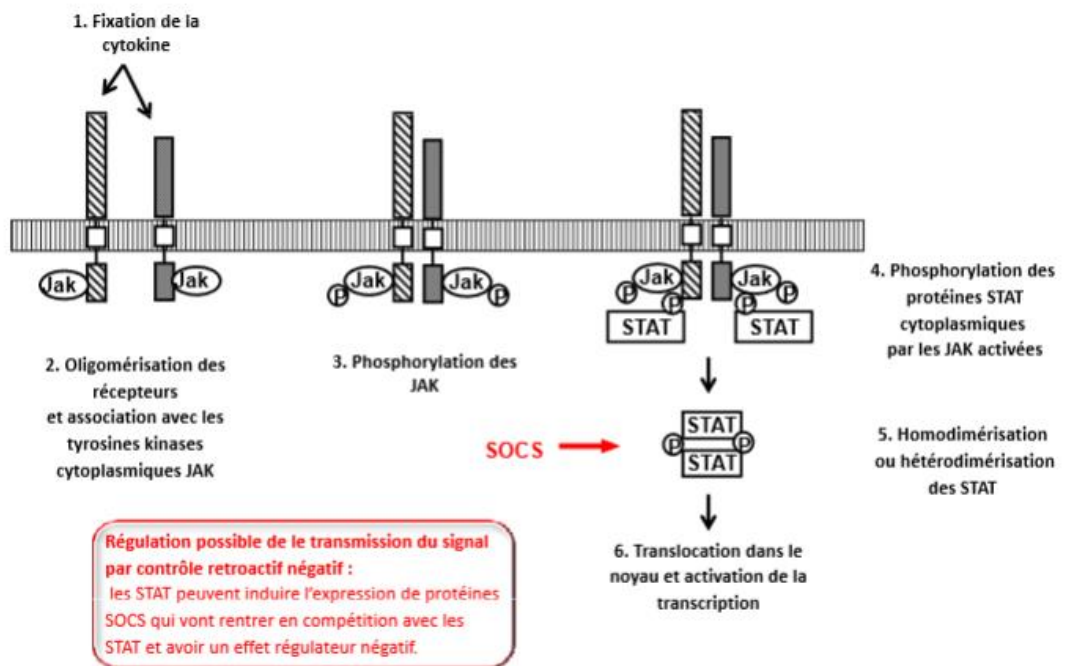


Figure 4.9. La voie JAK STAT

3.2. La signalisation lymphocytaire

3.2.1. La signalisation des lymphocytes B

3.2.1.1 .Structure du BCR

La BCR est connu pour jouer un rôle à la fois dans la réponse humorale (physiologique ou bien pathologique) (Young et Staudt, 2013), dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative mais aussi dans la lymphoprolifération B malignes.

La liaison de l'antigène au BCR permet l'activation de la cascade des signaux de transduction, l'internalisation et l'apprêtement ("*processing*") des complexes BCR/antigène. Le BCR, identifié pour la première fois en 1970 (Raff et al., 1970), est un complexe multimérique transmembranaire, composé d'une partie de liaison au ligand (immunoglobuline de surface (Ig) et des molécules de transduction du signal associées de manière stable mais non covalente : CD79a (Ig α) et CD79b (Ig β) (**Figure 4.10**). L'immunoglobuline de surface (IgD, IgM, IgE, IgG) est composée de deux chaînes légère (L) kappa (κ) ou lambda (λ) et deux lourdes (H) identiques (Giachino et al., 1995). L'extrémité C-terminale du BCR contient la région variable (V) et l'extrémité N-terminale par la région constante (C). La partie liée à d'antigène (Fab) de l'Ig est constituée d'une chaîne légère et d'un fragment d'une chaîne lourde, alors que (Fc) inclut la majeure partie de la région C de la chaîne lourde (C_H).

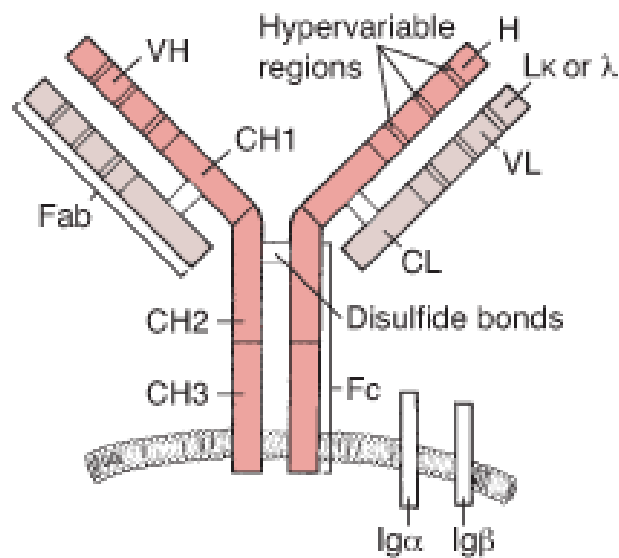


Figure 4.10. La structure du BCR.

La BCR exprime une capacité unique à reconnaître de nombreux antigènes différents (soit auto, allo ou xéno-antigènes) (Catera et al., 2008). Cependant, la spécificité et l'affinité du BCR peuvent différer d'un lymphocyte B à un autre. L'évolution de cette diversité est générée par un mécanisme génétique qui a lieu dans les régions variables légères (V_L) et les chaînes lourdes (V_H) de l'Ig et appelé réarrangement V(D)J. Ces trois gènes codent pour des éléments fondamentaux de la région de liaison à l'antigène du fragment (Fab). Le chromosome humain 14 code pour de multiples copies des gènes V, D et J. Au cours du développement des lymphocytes B (**Figure 12**), une recombinaison entre ces segments a lieu à fin de générer la séquence VDJ codant alors pour l'Ig du BCR. Au vu du grand nombre de segment V, D et J (et des recombinaisons possibles) et des mécanismes additionnels permettant d'étendre cette diversité, chaque lymphocyte B possède un récepteur unique.

3.2.1.2. Signalisation du BCR

Lors de la liaison de l'antigène au BCR, ce dernier déclenche l'activation en aval d'une cascade de signalisation intracellulaire et la formation d'un réseau de signalisation subcellulaire régulant divers fonction des lymphocytes B telles que la croissance, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Eeva and Pelkonen, 2004; Jumaa et al., 2005). La liaison induit ainsi l'activation de CD79a/CD79b ($Ig\alpha$, $Ig\beta$), indispensable à la transduction du signal grâce à la présence d'une séquence de transduction du signal appelée ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Cette séquence, située dans la partie intracellulaire de CD79a, permet l'association des tyrosines kinases avec des domaines SH2 (*Src-Homology 2*) présents sur les protéines de la famille des Protéine-tyrosine kinases (PTK) de la famille Src. Il existe trois familles de PTK qui sont engagées dans la transduction du signal : la famille Src (p59Fyn, p53/p56Lyn, p55Blk, p59Fyn, p56Lck), la famille Syk/ZAP-70, et la famille Tec (telle que Btk). Le complexe $Ig\alpha$, $Ig\beta$ joue un rôle crucial dans la transduction du signal et l'activation BCR. Chez des souris "knock-out" invalidées pour les gènes CD79a ou CD79b présentent une interruption brutale dans le développement des lymphocyte B au stade de cellules pré-B et les lymphocytes B matures présents sont également déficientes fonctionnellement (Smith and Reth, 2004).

La phosphorylation du motif ITAM par la tyrosine kinase Lyn initie la formation du signalosome, un ensemble de molécules intracellulaires telles que la kinase Syk (*Spleen*

tyrosine kinase). la phospholipase C2 (PLC2), PI3K (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*), la tyrosine kinase de Bruton (BTK), BLNK (*B-cell linker*) et la proto-oncogène VAV (**Figure 13**) (Fruman et al., 2000). Ce dernier permet la régulation coordonnée des événements cellulaires en aval tels que le flux de calcium, l'intériorisation de l'antigène et les changements dans l'expression génique.

Une fois activé, Syk propage le signal en s'associant à plusieurs protéines adaptatrices et phosphoryle des molécules de signalisation. Cela se traduit par l'activation de produits intermédiaires de signalisation clés, tels que le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2). PI3K génère le second messager phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), qui recrute la kinase Akt et d'autres molécules de signalisation BCR à la membrane cellulaire où ils deviennent activés. L'activation de PLC γ 2 conduit à la libération intracellulaire du calcium (Ca $^{2+}$) et l'activation de la protéine kinase C (PKC). La cascade de signalisation aboutit en l'activation des voies de signalisation MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) et NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) (**Figure 4.11**) (Efremov et al., 2007; Niirö and Clark, 2002). En plus, le signal du BCR est modulé par des signaux positifs comme le signal du co-récepteur CD19 ou par des signaux négatifs comme le co-récepteur CD22 et Fc γ RIIB1.

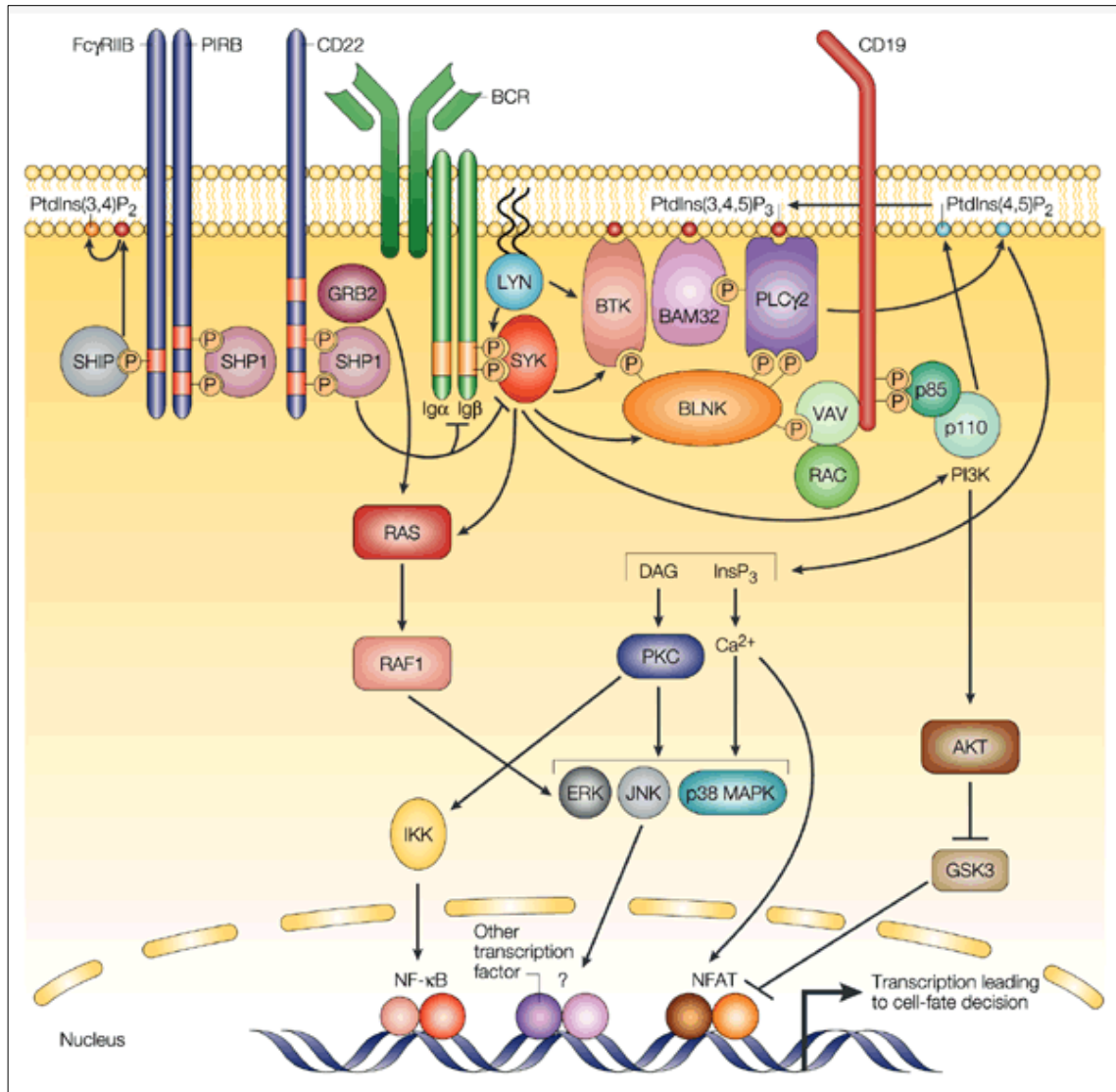


Figure 4.11. Représentation schématique de la transduction du signal par le BCR et les voies de signalisation. (Niiró and Clark, 2002).

Le CD22 contient dans sa partie cytoplasmique, des motifs ITAM phosphorylés par Lyn après légalion du BCR. Des sites de liaison de type SH2 sont ainsi créés et CD22 va exercer son effet négatif en recrutant par ces domaines, la tyrosine phosphatase SHP-1 (*SH2 containing tyrosine phosphatase-1*). Les substrats de SHP-1 regroupent entre Syk, BLANK et CD22. Il est connue que la déphosphorylation de Syk et la kinase Src diminue leur activité et donc empêche la phosphorylation additionnelle des ITAM du BCR. Le CD19 participe à l'induction des signaux inhibiteurs du CD22 en favorisant l'activation de Lyn.

Le récepteur FcγRIIB ou CD32 exerce un effet négatif sur la signalisation de BCR et inhibe la prolifération des lymphocytes B. Tous comme le CD22, le FcγRIIB assure son signal inhibiteur pas le biais par le même mécanisme. La phosphorylation de SHP-1 déphosphoryle le CD19 en plaquant le recrutement et l'activation de la PI3K (Fong et al., 2000; Hippen et al., 1997).

L'activation de l'ensemble de ces voies est nécessaire pour une réponse complète faisant suite à la liaison de l'antigène (Jun and Goodnow, 2003). Lors d'une stimulation antigénique suboptimale, comme cela se produit avec l'auto-antigènes solubles (faible affinité), peut induire une signalisation tolérogène qui se caractérise par la seule activation d'ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) et de NF-AT (Healy et al., 1997).

3.2.2. La signalisation du récepteur TCR

4. Altération de la signalisation et cancers

4.1. Lymphocytes B à l'état pathologique

La leucémogénèse comprend un ensemble de mécanismes responsables de la transformation d'une cellule hématopoïétique normale en cellule leucémique. Lors de ce processus, une cellule hématopoïétique normale acquiert progressivement des propriétés d'autorenouvellement, de réponse accrue aux signaux prolifératifs et diminuée aux signaux antiprolifératifs et une dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire permettant une prolifération cellulaire autonome. Elle possède alors un potentiel réplicatif illimité associé avec un contournement des mécanismes de sénescence et une résistance à l'apoptose. Il est connu que la transformation tumorale est un processus fait de plusieurs étapes qui résulte de l'accumulation d'anomalies génétiques (accumulation de mutations, de translocations chromosomiques, et ou de changements épigénétiques), le plus souvent acquises.

Il existe quatre grands types de leucémies. Elles sont classées en fonction de leur évolutivité (aiguë ou chronique) et de la lignée dont elle provient (lymphoblastique ou myéloblastique). On trouve ainsi la leucémie aiguë myéloïde (LAM), la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), la leucémie chronique myéloïde (LCM) et leucémie lymphoïde chronique (LLC).

Mon travail de thèse a porté sur la LLC qui est une lymphoprolifération des lymphocytes B due à une stimulation antigénique dont l'origine n'est pas entièrement comprise.

4.1. Leucémie Lymphoïde Chronique

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie maligne qui résulte d'une combinaison de défauts dans la régulation de l'apoptose (Kater et al., 2004) et d'un excès de prolifération des lymphocytes B (Chiorazzi et al., 2005). Cela résulte en l'infiltration et l'accumulation de lymphocytes B matures au niveau des compartiments sanguins, médullaires et ganglionnaires. Malgré le fait que la LLC est la leucémie la plus fréquente (représente environ 25% de toutes les leucémies de l'adulte) (Houlston et al., 2003), les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette pathologie ainsi que son étiologie restent à élucider.

Les principaux concepts concernant les processus biologiques qui régissent le développement de la LLC ont subi des changements considérables au cours la dernière décennie. Dans un premier temps la LLC a été considérée comme une accumulation de lymphocytes B tumoraux monoclonaux, matures, dans la moelle osseuse, le sang périphérique et le système lymphoïde, du fait de leur résistance à l'apoptose (Guipaud et al., 2003). Plus récemment, il a été décrit que les lymphocytes B résistant à l'apoptose sont renouvelés en permanence par la prolifération (Chiorazzi et al., 2005).

Phénotypiquement, les lymphocytes B de la LLC expriment des molécules de surface CD19, CD5 et CD23 avec une expression faible ou nulle de CD20, CD79b, IgM et IgD (Chiorazzi et al., 2005; Guipaud et al., 2003). Bien que les cellules issues de patients atteints de la LLC montrent une hétérogénéité phénotypique et une survie prolongée, ils semblent exprimer des taux très élevés de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Pers et al., 2002).

4.2. Signalisation du BCR dans la LLC

La signalisation du BCR joue un rôle important dans la pathogenèse de la LLC. Elle se distingue de la signalisation des lymphocytes B normaux et se caractérise par une expression

faible du BCR, une réponse variable pour une stimulation antigénique donnée et une activation renforcée des voies anti-apoptotiques (**Tableau 4.1**) (Woyach et al., 2012).

Tableau 4.1. Comparaison de la signalisation du BCR de LLC avec des lymphocytes B normaux (Woyach et al., 2012).

Caractéristique	Cellules LLC
Expression Ig	Faible
Expression CD79b	Faible
Réponse à la stimulation antigénique	Variable
Expression Syk/Lyn/Btk	Forte
Expression p110δ de PI3K	Normal
Activité kinase PI3K	Forte
Flux calcique	Variable/généralement faible

La signalisation du BCR regroupe une cascade de réactions (décrite précédemment/voir la signalisation du BCR dans le cas physiologique). Dans les lymphocytes B de patients atteints de la LLC, la signalisation du BCR débute par la phosphorylation de ZAP-70 (*Zeta-associated protein of 70 kD*) (**Figure 4.12**) (Chen et al., 2005, 2008), or celle-ci exprimée approximativement dans la moitié des cas de la LLC, en particulier ceux qui représente une maladie relativement agressive et des gènes d'IGVH non mutées. ZAP-70 peut renforcer la signalisation du BCR dans les lymphocytes B tumoraux facilitant le recrutement des autres kinases, telles que Syk, au complexe BCR. Dans tous les cas, le potentiel de signalisation accrue permis par l'expression de ZAP-70 est probablement en lien avec l'agressivité de la maladie (Dühren-von Minden et al., 2012). L'expression de ZAP-70 semble être plus élevée dans les tissus ou les cellules tumorales de la LLC prolifèrent (Boelens et al., 2007). L'expression de ZAP-70 est associée à l'augmentation de la signalisation du BCR dans la LLC, telle que mesurée par les taux de SYK phosphorylée après liaison de l'IgM *in vitro* (Chen et al., 2002). Cependant, le rôle de ZAP-70 dans la stimulation du BCR n'est pas encore bien connu.

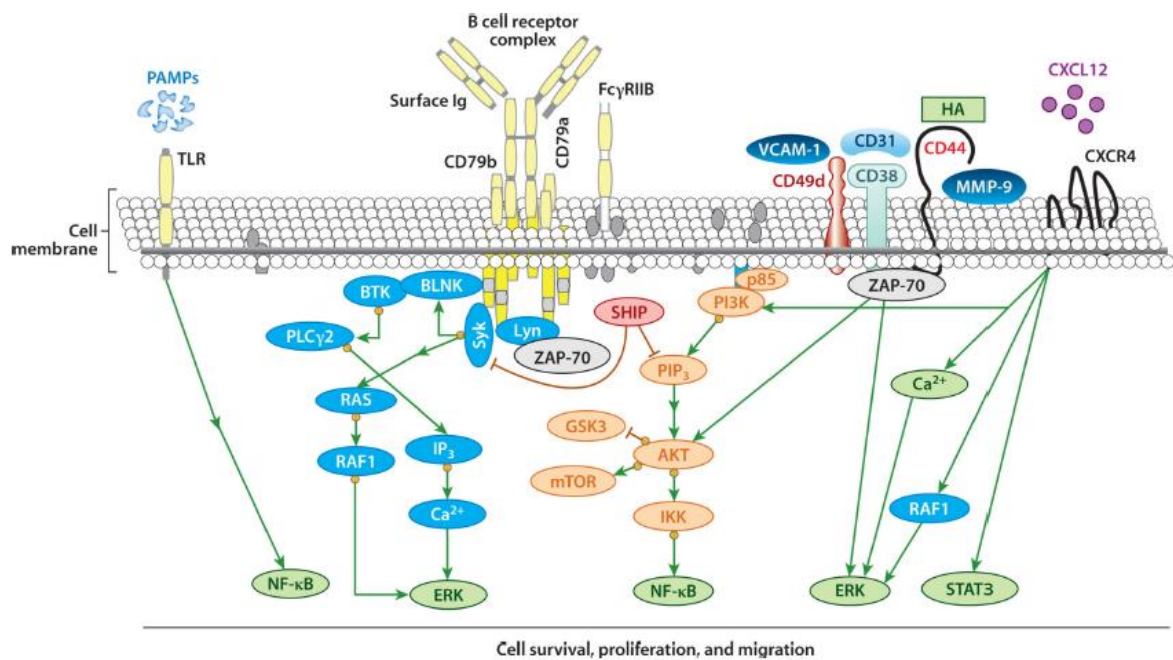


Figure 4.12. Représentation schématique de la transduction du signal par le BCR et les voies de signalisation dans la LLC (Zhang and Kipps, 2014).

La plupart des études ont suggéré que la signalisation du BCR est plus puissante dans les UM-LLC, de plus, il existe une réponse BCR déficiente due à une anomalie dans la transduction du signal (Karray et al., 1987; Lanham et al., 2003). Elle a été expliquée par un défaut dans les flux de calciques (Michel *et al.*, 1993), l'apoptose, la prolifération et la phosphorylation de diverses molécules en aval du BCR ainsi que par un défaut dans l'assemblage des différentes molécules du complexe BCR/CD79a/CD79b (Cragg et al., 2002; Payelle-Brogard et al., 2002; Vuillier et al., 2005). Les UM-LLC ont une expression génique et protéomique spécifique après une réponse à une stimulation antigénique soluble *in vitro*, avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération ou l'apoptose (Perrot et al., 2011; Vallat et al., 2007). Toutefois, en raison de l'association entre le statut de mutation et ZAP-70, CD38 ou l'expression de l'Ig, l'augmentation du signal pourrait aussi être en lien avec ces facteurs (Chen et al., 2005; Lanham et al., 2003).

D'autres récepteurs comme le CD38 sont impliqués dans la signalisation des lymphocytes B tumoraux de la LLC. CD38 est une glycoprotéine membranaire d'environ 45

kDa, pourvue d'une activité ADP-ribosyl cyclase et hydrolase et qui se comporte également comme un récepteur membranaire, intervient dans l'adhésion et la signalisation cellulaire par son interaction avec le ligand CD31, jusqu'alors été bien étudié dans la LLC. Il a été démontré que l'expression de CD38 peut influencer la signalisation du BCR dans la LLC (Zupo et al., 1996). Dans une étude portant sur des patients atteints de LLC, où l'expression de l'IgM était identique, deux groupes ont été distingués par l'expression de CD38. L'expression faible de CD38 a été associée à l'absence de flux calcique. L'activation de CD38 ne semble pas produire de flux de Ca^{+} , et ne modifie pas le BCR pour induire ce dernier. De plus, l'apoptose peut avoir lieu dans les cellules exprimant fortement le CD38 stimulées par BCR, mais pas dans les cellules CD38 faible. Aussi des études ont montré que le CD38 induit la prolifération des lymphocytes B de la LLC et augmente leur survie (Deaglio et al., 2003). D'autres études ont trouvé des relations similaires entre l'expression de CD38 et la capacité de signalisation du BCR, mais il est difficile de savoir si une meilleure signalisation du BCR est due à l'expression des Ig, CD38, ZAP-70 ou encore au statut mutationnel (Lanham et al., 2003; Nédellec et al., 2005).

Un autre co-récepteur impliqué dans la LLC est CD40. Dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative, plusieurs signaux sont nécessaires. Le premier signal est l'engagement du BCR, mais d'une façon générale des signaux secondaires sont nécessaires pour que les lymphocytes B s'activent en réponse à l'antigène. Un exemple de ces signaux secondaires est la voie de co-stimulation pour de CD40 présent à la surface les cellules B liant le CD40 (CD40L, CD154) porté par les lymphocytes T (Elgueta et al., 2009). CD40L peut être exprimé par les lymphocytes T dans le microenvironnement ou par les cellules LLC elles-mêmes (Schattner et al., 1998; Willimott et al., 2007a). L'augmentation de l'expression du CD40L peut également être une conséquence d'une activité accrue de NF- κ B, car le CD40L est un gène cible de ce facteur de transcription (Pham et al., 2005). L'expression intracellulaire de CD79a, CD79b et IgM est augmentée par la stimulation du CD40 dans la LLC (Minuzzo et al., 2005). Enfin la liaison au BCR conduit à la phosphorylation de ERK et AKT dans la moitié des patients, alors que le traitement par CD40L/IL-4 produit ces phosphorylations dans tous les cas (Herling et al., 2009).

D'autres molécules du microenvironnement ont des effets sur la signalisation du BCR. Ainsi, l'engagement du BCR module la sensibilité des cellules B à plusieurs chimiokines, y

compris CXCL12 (**Figure 4.12**) (Bleul et al., 1998), ce qui suggère que la signalisation du BCR a un effet sur la migration des cellules B. L'activation de Syk est également importante pour l'adhésion cellulaire et la chimiotaxie de lymphocytes B sains et LLC, ainsi que dans la signalisation du BCR. Les récepteurs TLR (*Toll-like receptors*) (**Figure 4.12**) sont importants pour l'établissement de l'inflammation et réalisant un pontage entre les systèmes immunitaires adaptatif et inné. De manière intéressante, la stimulation du BCR peut réguler positivement l'expression de TLR.

Chapitre 5 : Les biothérapies et la thérapie ciblée

Actuellement, le traitement des cancers se tourne de plus en plus vers une médecine personnalisée. La grande majorité des médicaments des thérapies non ciblées comme la chimiothérapie, l'hormonothérapie et la radiothérapie ont été conçus pour bloquer la multiplication cellulaire en ciblant l'ADN de la cellule de façon anarchique ou au fuseau mitotique nécessaire à la division cellulaire. L'inconvénient de ces approches est la relative non-spécificité des médicaments qui ne peuvent épargner les cellules saines. Il s'ensuit des effets secondaires.

Les découvertes de biologie moléculaire, suscitées par le "Projet Cancer" initié au début des années 1970, débouchent maintenant sur de nouveaux axes thérapeutiques comme biothérapie et la thérapie ciblée n'utilisant plus l'atteinte cytotoxique, comme moyen de guérir le malade, mais plutôt l'utilisation d'un frein pour ralentir ou arrêter le développement des métastases, n'entraînant pas obligatoirement la mort des cellules cancéreuses mais réduisant considérablement leur potentiel délétère.

1. La biothérapie

1.1. Définition

La biothérapie est l'ensemble des médicaments et des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de molécules conçues à partir d'un organisme vivant ou de ses produits. Elle repose sur l'utilisation des organismes vivants comme les levures, les ferments, certains microbes, des gènes, des cellules, ou des tissus. En utilisant des substances (ou mimétiques) prélevées sur des organismes vivants des hormones, des anticorps, des interleukines...

Les biothérapies peuvent s'appliquer pour le traitement du cancer mais elles concernent aussi de nombreuses autres maladies, comme les maladies inflammatoires, les maladies autoimmunes.

1.2. Mode d'action

En cancérologie, les biothérapies peuvent agir à différents niveaux pour réduire la propagation tumorale :

- En arrêtant, contrôlant ou supprimant les processus de croissance tumorale.
- En marquant les cellules cancéreuses afin de faciliter leur destruction par le système immunitaire.
- En augmentant la puissance de destruction des cellules tumorales par les cellules du système immunitaire (il s'agit de l'immunothérapie)
- En empêchant la propagation des cellules cancéreuses (métastases)
- Afin de développer des biothérapies sont pour explorer les mécanismes moléculaires de la pathologie
- Décrypter un processus physiopathologique
- Identification d'une cible clé dans le développement de la pathologie
- Développement de la forme thérapeutique la plus adaptée pour agir sur cette cible

1.3. Les stratégies

Les thérapies utilisant des médicaments copiant des molécules naturelles du corps humain et synthétisés par des bactéries ou des cellules, tels que des anticorps, des protéines bioactives (facteurs de croissance, cytokines, protéines recombinants). Différentes stratégies sont utilisées :

- Les thérapies cellulaires (cellules souches ou différenciées)
- Les thérapies tissulaires (différentes greffes de tissus vivants)
- Les thérapies géniques (transfert de gènes, intervention sur les gènes)

2. Les capacités distinctives des cancers

Les cancers acquièrent six capacités distinctives que sont l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité à éviter l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases.

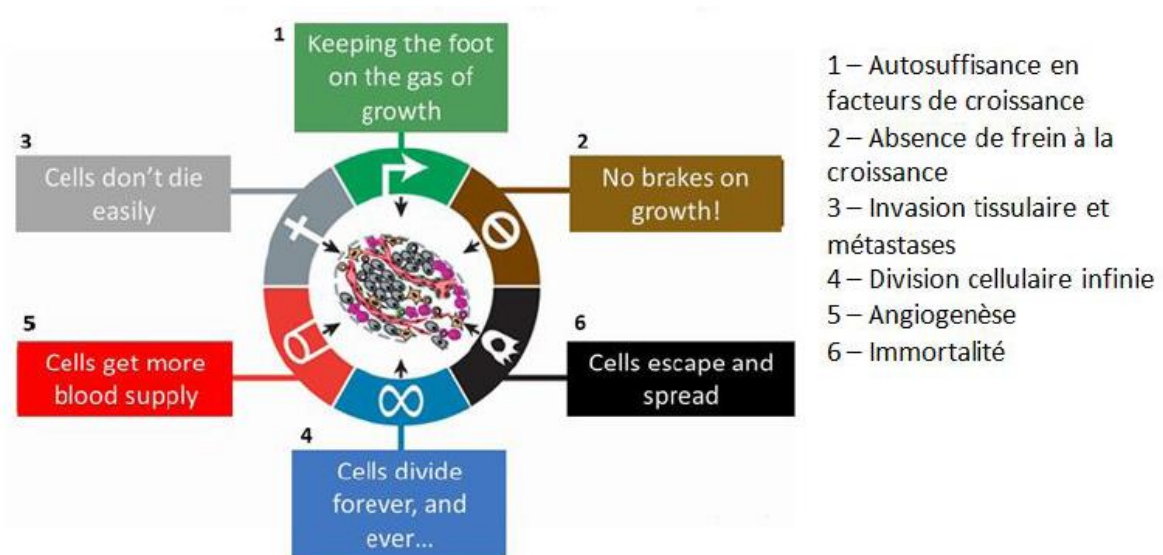


Figure 5.1. Les capacités distinctives des cancers.

3. la biothérapie : la thérapie génique

3.1. Définition

La thérapie génique : constitue un autre mode de traitement d'un trouble génétique par lequel une insertion de nouveaux gènes dans les cellules humaines

Les cancers sont provoqués par des oncogènes, ces gènes défectueux qui produisent des protéines défectueuses. Ces dernières peuvent être non fonctionnelles, ou elle fonctionne mal ou à des comportements très agressive.

3.1. Les étapes de la thérapie génique somatique ex vivo utilisant des virus modifié comme vecteur

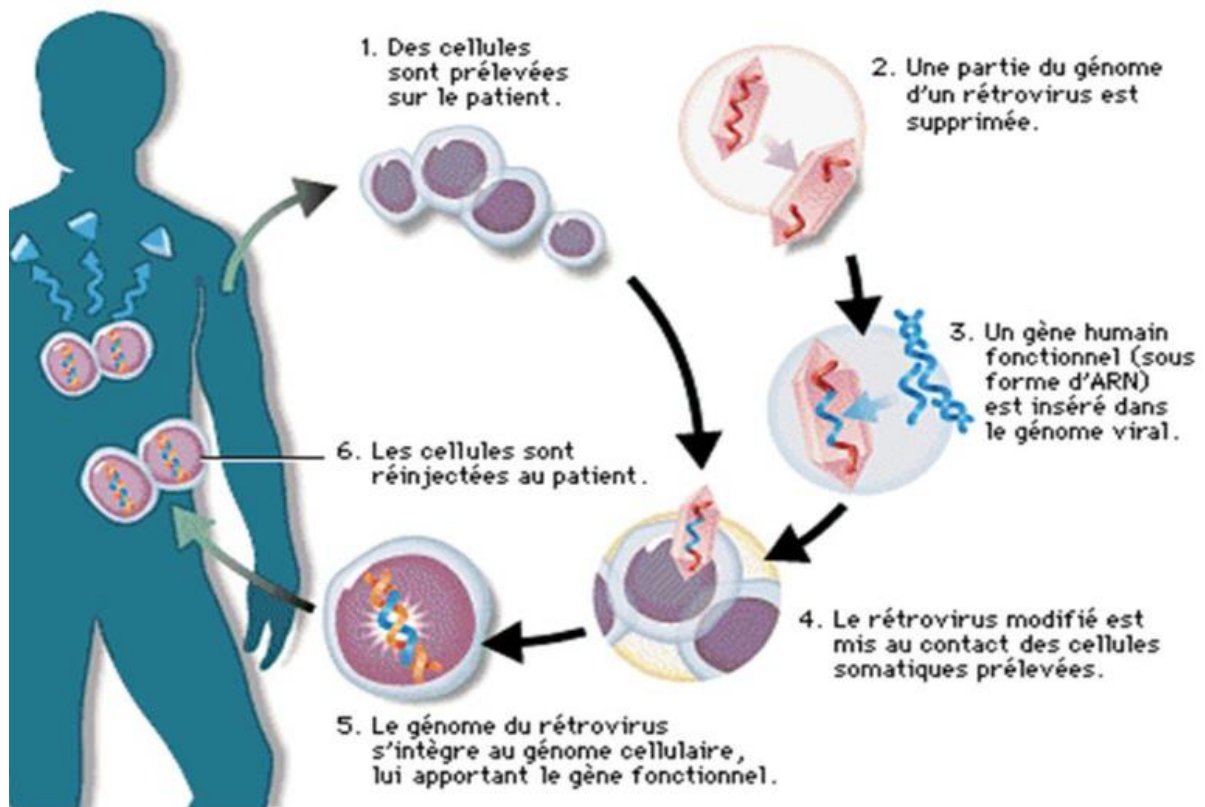


Figure 5.2. Les étapes de la thérapie génique somatique ex vivo utilisant des virus modifié comme vecteur.

4. la biothérapie : la thérapie cellulaire

4.1. définition

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. L'objectif est de soigner durablement le patient grâce à une injection unique de cellules thérapeutiques. Ces cellules sont obtenues à partir de cellules souches pluripotentes (pouvant donner tous types de cellules) ou multipotentes (pouvant donner un nombre limité de types de cellules) provenant du patient lui-même ou d'un donneur. De nombreuses approches de thérapie cellulaire sont en cours de développement. Quelques-unes sont en outre déjà validées.

4.2. Rôle

Les rôles de la thérapie cellulaire:

- Réparer une fonction déficiente
- Reconstitution du tissu d'origine
- Reconstitution d'un tissu autre que celui d'origine (plasticité)

4.3. Plasticité des cellules souches

La plasticité des cellules souches embryonnaires et adultes est par définition, une des caractéristiques de l'état souche (car les cellules sont toti ou pluripotentes) tandis que la plasticité par transdifférenciation d'une cellule adulte déjà engagée dans une voie de différenciation. Les cellules souche ont une grande capacité à se transformer (plasticité) en différents types de cellules, les cellules souches offrent des perspectives thérapeutiques prometteuses en thérapie cellulaire.

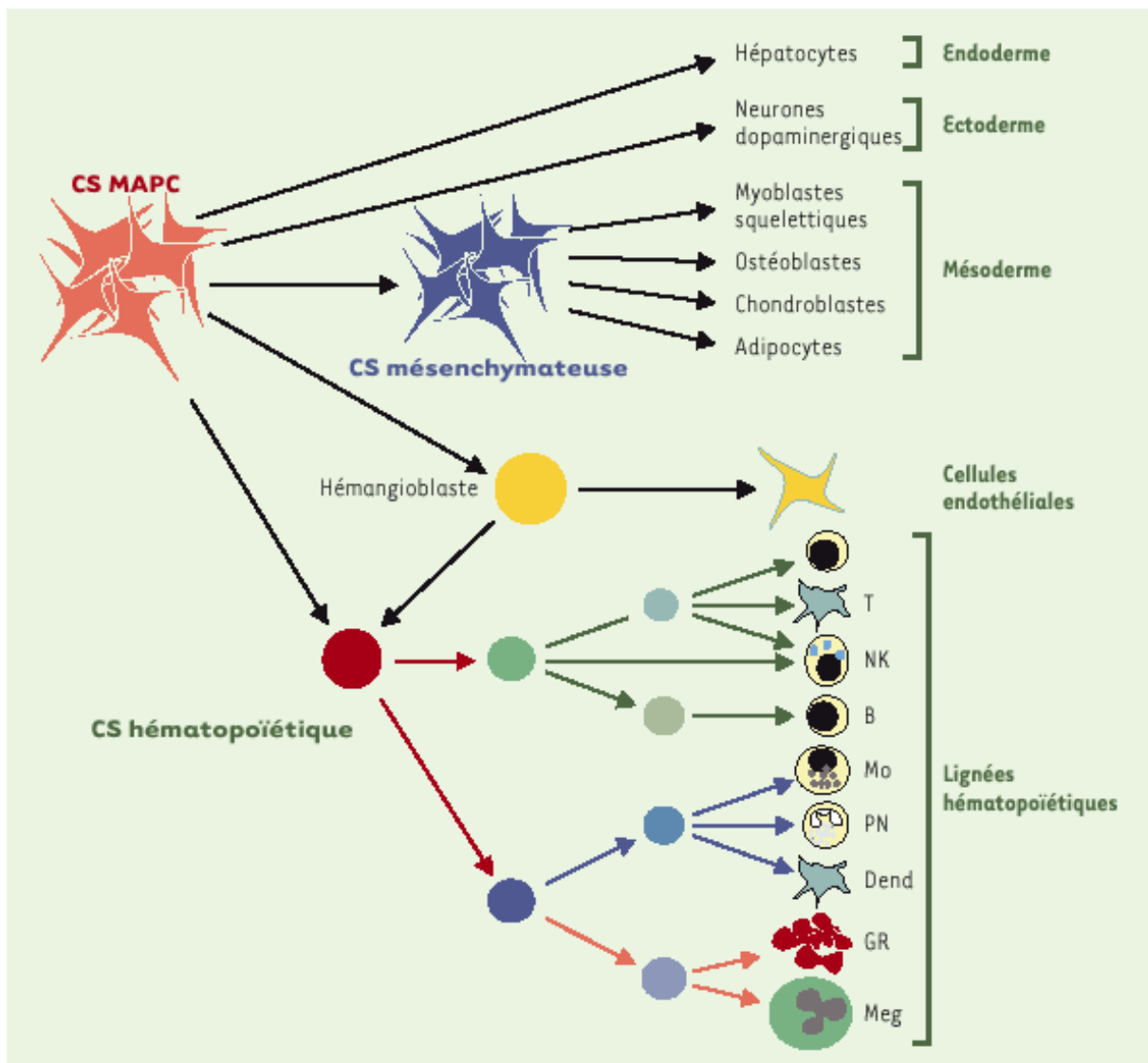


Figure 5.3. Plasticité des cellules souches

4.4. La cellule souche embryonnaire

La cellule souche embryonnaire :

- est capable de proliférer à l'infini (auto-renouvellement)
- est capable de produire tous les types cellulaires (pluripotence)
- exprime des gènes qui lui permettent de rester indifférenciée (auto-renouvellement et pluripotence)

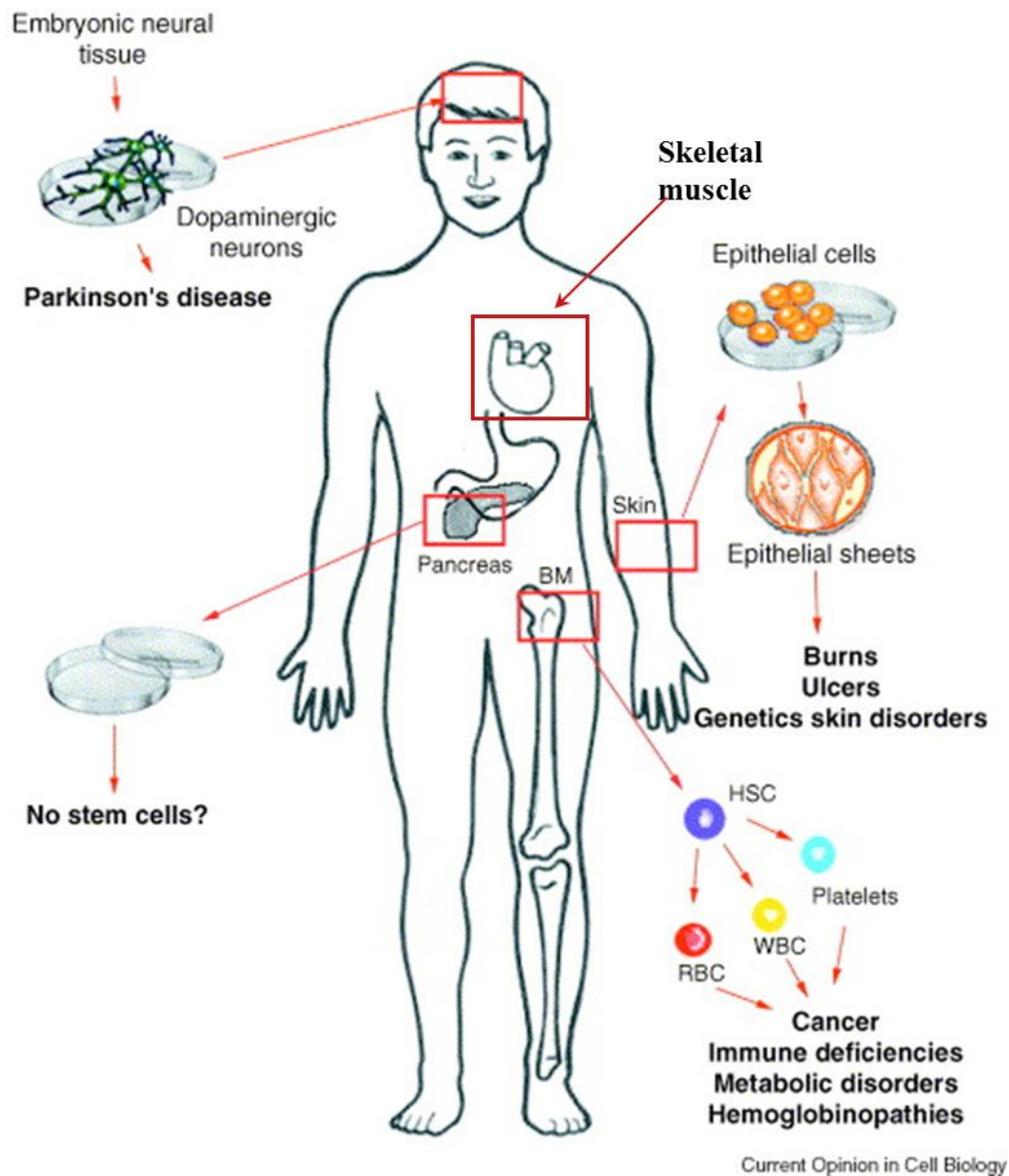


Figure 5.4. La cellule souche embryonnaire

5. La biothérapie : Les anticorps monoclonaux

5.1. Définition

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps fabriqués par des cellules en culture pour traiter des maladies spécifiques. Plusieurs anticorps monoclonaux sont mis sur le marché pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques (telles que la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, etc.), de cancers et du rejet de greffe. Ils ont révolutionné la prise en charge de nombreuses maladies.

5.2. Mode d'action

5.2.1. Dirigés contre une cible cellulaire précise dont ils bloquent l'action

Deux récepteurs de la famille des tyrosines kinases sont des cibles :

HER2 : Herceptin® (Trastuzumab) : Cancer du sein en association à la chimiothérapie.

EGFr : Erbitux® (cetuximab) : Cancer du côlon et des voies aérodigestives supérieures.

5.2.2. Dirigés contre un facteur de contrôle de la croissance cellulaire

Le facteur de croissance le plus ciblé est : anti-VEGF : Avastin® (bevacizumab).

5.2.3. Couplés à d'autres agents anti-cancéreux

anti-CD33 : Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) couplé à de l'aclacinomycine.

anti-CD20 : Zevalin (Ibritumomab tiuxétan) couplé à un agent radioactif.

6. Les thérapies ciblées

6.1. Définition

Thérapies ciblées est une forme de biothérapie pour traitement peuvent être classées en fonction de leur composition et, dans ce cas, on distingue deux types de thérapies ciblées :

- les anticorps monoclonaux qui vont se lier spécifiquement à certaines protéines présentes à la surface de la cellule cancéreuse ou présentes sur des cellules de son environnement (stroma).
- les petites molécules qui sont capable de pénétrer à l'intérieur des cellules cancéreuses ou dans des cellules de l'environnement du cancer.

Elles peuvent être classées également en fonction de leur mode de fonctionnement, ou de ce qu'elles ciblent au sein des cellules. Suivant cette classification on peut grouper ces médicaments comme suit :

- les inhibiteurs d'enzymes qui vont interagir avec une ou des étapes de l'activation des facteurs de croissance cellulaire
- les inducteurs de l'apoptose
- les inhibiteurs de l'angiogenèse et la néo-angiogenèse

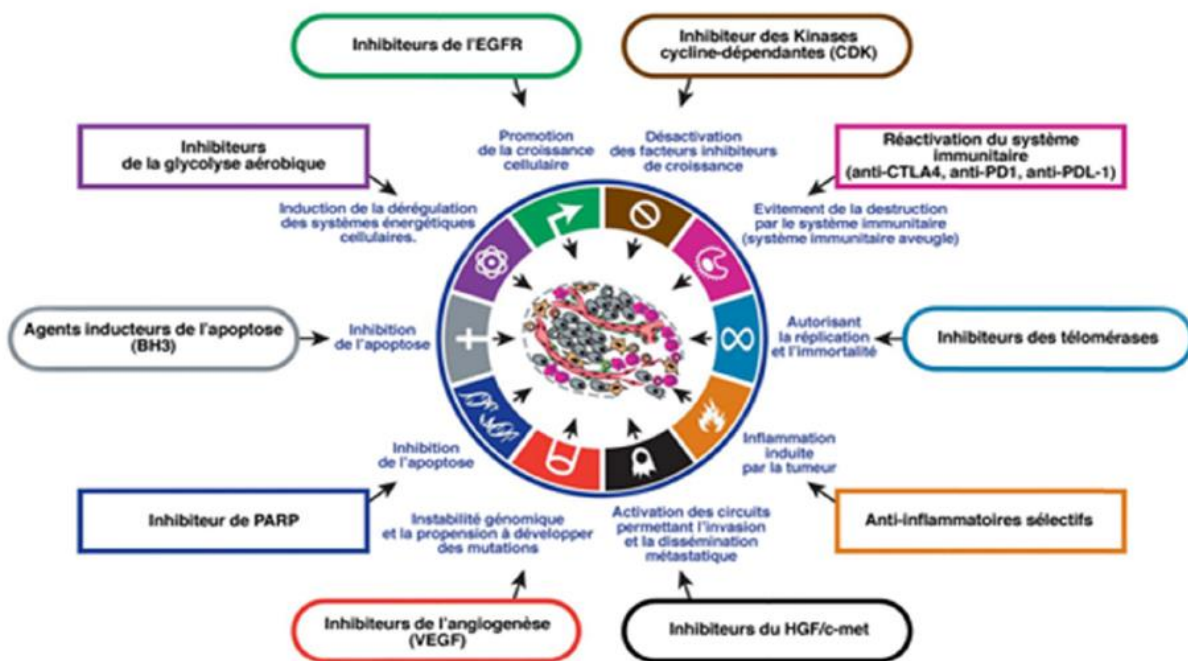


Figure 5.5. Les cibles de la thérapie ciblée.

6.2. Mode d'action

Les thérapies ciblées constituent une nouvelle classe thérapeutique du traitement du cancer dont le nombre de molécules disponibles n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années.

Le qualificatif ciblé fait référence au fait que ces traitements sont développés pour bloquer une anomalie moléculaire identifiée dans la tumeur et impliquée dans les mécanismes de l'oncogenèse (prolifération tumorale, angiogenèse...). Ces thérapies visent les anomalies moléculaires plutôt que l'origine de la tumeur primitive. Elles font partie de ce que l'on désigne sous le terme de « médecine de précision ». Elle cible essentiellement : Les voies de signalisation intracellulaires, les récepteurs membranaires et acteurs intracellulaires.

6.3. Classification des molécules de la thérapie ciblée

- Elles peuvent être classées selon le lieu de leur cible en deux grandes familles :

6.3.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux pour viser une cible extra-cellulaire "mab".

Ce sont de grandes molécules produites en laboratoire. Leur mode d'action est similaire aux anticorps naturels produits par le système immunitaire. Ils reconnaissent et se lient spécifiquement à certaines protéines présentes à l'extérieur ou à la surface des cellules cancéreuses (récepteurs) et qui les incitent à se diviser de façon incontrôlée ou à survivre. Ils neutralisent ces protéines et par conséquent stoppent la croissance tumorale. Ils peuvent être combinés à un médicament de chimiothérapie, à une toxine ou à une substance radioactive dans le but de les délivrer spécifiquement aux cellules cancéreuses. Ils sont toujours administrés par voie intraveineuse.

6.3.2. Les petites molécules

Les petites molécules pour viser une cible intra-cellulaire "nib". Elles pénètrent à l'intérieur des cellules cancéreuses. Elles neutralisent une parmi les cibles responsables de la croissance maligne. Elles sont actives par voie orale

- Les médicaments de thérapie ciblée peuvent être classés en fonction de leur mode de fonctionnement, ou de ce qu'ils ciblent au sein des cellules.

6.3.3. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Comme Bcr-abl : Glivec (imatinib).

6.3.4. Les inhibiteurs de la transduction des signaux produits

Les inhibiteurs de la transduction des signaux produits par l'activation des récepteurs à tyrosine kinases par différents agonistes

- Selon leur cible au sein de la cellule

Les médicaments affectant la transduction des signaux à l'intérieur des cellules, à partir d'un récepteur, habituellement membranaire

6.3.5. Les inhibiteurs d'enzymes

Les enzymes sont des protéines qui accélèrent les processus biologiques. Ils inhibent certaines enzymes responsables de la division des cellules cancéreuses.

Les inhibiteurs de la tyrosine kinase qui est une enzyme jouant un rôle important dans la croissance et la division des cellules, bloquent des tyrosines kinases spécifiques qui indiquent aux cellules cancéreuses de se développer.

- Selon leur cible au sein de la cellule

Les médicaments affectant la transduction des signaux à l'intérieur des cellules, à partir d'un récepteur, habituellement membranaire

- Les molécules bloquant l'angiogénèse
- Les produits affectant la transduction et/ou la mécanique du cycle cellulaire
- Les substances stimulant l'apoptose et/ou la dégradation des protéines

6.4. Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées

Tableau 5.1. Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées.

Résistance primaire	Résistance secondaire
<ul style="list-style-type: none">- Résistance pharmacologique- Activation de voies de signalisation parallèles (contournement)- Cible non cruciale (pas d'addiction)	<ul style="list-style-type: none">- Mutation au site de liaison du médicament- Amplification génomique en aval de la cible- Différenciation à partie des cellules souches tumorales- Adaptation du micro-environnement tumoral

7. La thérapie ciblée dans la LLC

7.1. Les molécules thérapeutiques ciblant la signalisation du BCR dans la LLC

L'ibrutinib : est un inhibiteur de BTK. Cette substance agit en se liant à l'enzyme BTK de manière irréversible à la cystéine (Cys-481) dans le site de liaison à l'ATP de BTK, ce qui a comme conséquence le blocage de la transmission des signaux de survie dans les cellules B.

Les mécanismes d'action de l'ibrutinib ont été étudiés in vivo. Herman et ses collaborateurs ont rapporté que dans les cellules de LLC, l'ibrutinib induit une diminution de Ki67 dans le sang périphérique et les ganglions (Herman et al., 2011) et réduit la chimiotaxie induite par CXCL12, CXCL13 et l'adhésion à l'intégrine (Ponader et al., 2012; Rooij et al., 2012).

L'idelalisib : est un inhibiteur de PI3K δ qui agit en se liant de manière réversible au site catalytique de PI3K δ induisant l'apoptose des lymphocytes B (Hallek, 2015). Il a été montré ex vivo que l'idelalisib inhibe la chimiotaxie des cellules de la LLC et la migration des cellules stomales, et réduit la sécrétion de cytokines et le signaux de survie générés par une co-culture stromale après activation du BCR (Hoellenriegel et al., 2011).

Fostamatinib, R406 : le Fosmatinib se convertit in vivo en forme active R406. Ce dernier est un inhibiteur réversible spécifique de SYK (Quiroga et al., 2009) et induit l'apoptose des lymphocytes (Gobessi et al., 2008).

Dasatinib : est un inhibiteur réversible des tyrosines kinases de la famille Src (inhibiteur compétitif de l'ATP). Le dasatinib induit l'apoptose des cellules de LLC (Veldurthy et al., 2008).

Tableau 5.2. Les molécules thérapeutiques ciblant la signalisation du BCR dans la LLC.

Molécule cible	Molécule inhibitrice	Mécanisme d'action
PI3K δ	idelalisib	Inhibe la sous unité p110 δ de PI3K
BTK	Ibrutinib (PCI-32785)	Inhibe irréversiblement la phosphorylation de BTK
Syk	R406, fostamatinib	Inhibe Syk
Lyn	dasatinib	Inhibe les kinases de la famille Src

7.2. Les molécules thérapeutiques ciblant les récepteurs dans la LLC

L'ofatumumab : l'ofatumumab est un anticorps monoclonal humain qui se lie à un épitope de l'antigène CD20.

L'obinutuzumab : l'obinutuzumab est un anticorps monoclonal recombinant anti-CD20 de type 2.

Chapitre 6 : Immunothérapies : de la paillasse à la clinique

1. Immunologie en biothérapie

1.1. Définition

L'immunothérapie consistant à utiliser des éléments du système immunitaire pour exercer un effet thérapeutique. L'immunothérapie des cancers vise à amplifier la réponse immunitaire antitumorale naturelle contre les cancers.

2.2. Mode d'action

L'immunothérapie ne vise pas directement la tumeur. Elle agit principalement sur le SI du patient pour le rendre apte à attaquer les cellules cancéreuses. Aussi, l'immunothérapie spécifique consiste à stimuler certaines cellules immunitaires pour les rendre plus efficaces ou à rendre les cellules tumorales plus reconnaissables par le SI.

Elle repose sur les anticorps monoclonaux, notamment les inhibiteurs de points de contrôle, les anticorps bispécifiques, le transfert adoptif de cellules ou encore la vaccination anti-tumorale.

5. Immunothérapie : cible les inhibiteurs de checkpoints

L'identification dans les années 1990 du rôle des molécules CTLA-41 et PD-1, des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T (LT), dans le contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale, a conduit à l'attribution du Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2018 à James Allison et Tasuku Honjo. Ces récepteurs inhibiteurs définissent ainsi des points de contrôle immunologique, communément nommés par l'anglicisme immune checkpoints, indispensables pour éviter un retentissement délétère de la réponse immunitaire sur les tissus sains et ainsi garantir l'intégrité de l'hôte.

5.1. Les inhibiteurs de checkpoints : CTLA-4 et son ligand

La molécule CTLA-4 (*antigène du lymphocyte T Cytotoxique 4*) module l'amplitude de l'activation précoce des LT et inhibe l'activité de CD28, un co-récepteur activateur majeur de ces cellules (**Figure 6.1**).

La protéine CTLA-4 est stockée constitutivement dans des compartiments intracellulaires du LT au repos. Dès qu'un certain niveau d'activation est atteint, ces molécules sont rapidement transloquées à la surface de la membrane de la cellule afin d'être fonctionnelles au niveau de la synapse immunologique. C'est ainsi que CTLA-4 va entrer en compétition avec CD28 pour se lier, lui aussi, aux co-récepteurs CD80 et CD86 (Figure 6.). Cependant, son affinité et son avidité étant plus fortes que celles de CD28, CTLA-4 va moduler négativement la signalisation du TCR.

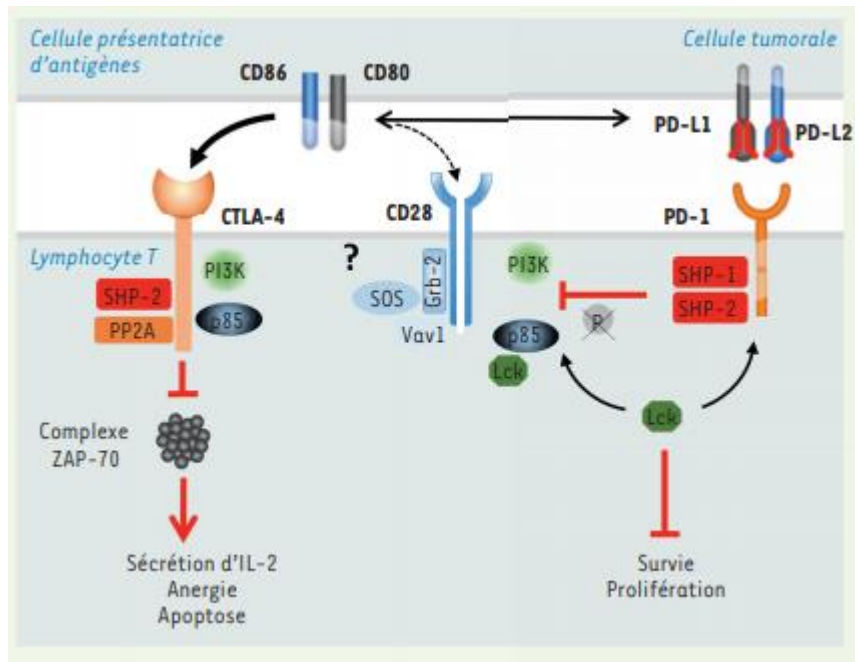


Figure 6.1. Principaux mécanismes de régulation de l'activation du lymphocyte T par CTLA-4/CD28.

5.2. Les inhibiteurs de checkpoints : PD1 et son ligand

La molécule PD-1 (Programmed death-ligand 1) est, elle, exprimée par les LT mémoires et effecteurs, et semble intervenir dans la régulation des cellules chroniquement activées, comme lors des processus inflammatoires (Figure 6.2).

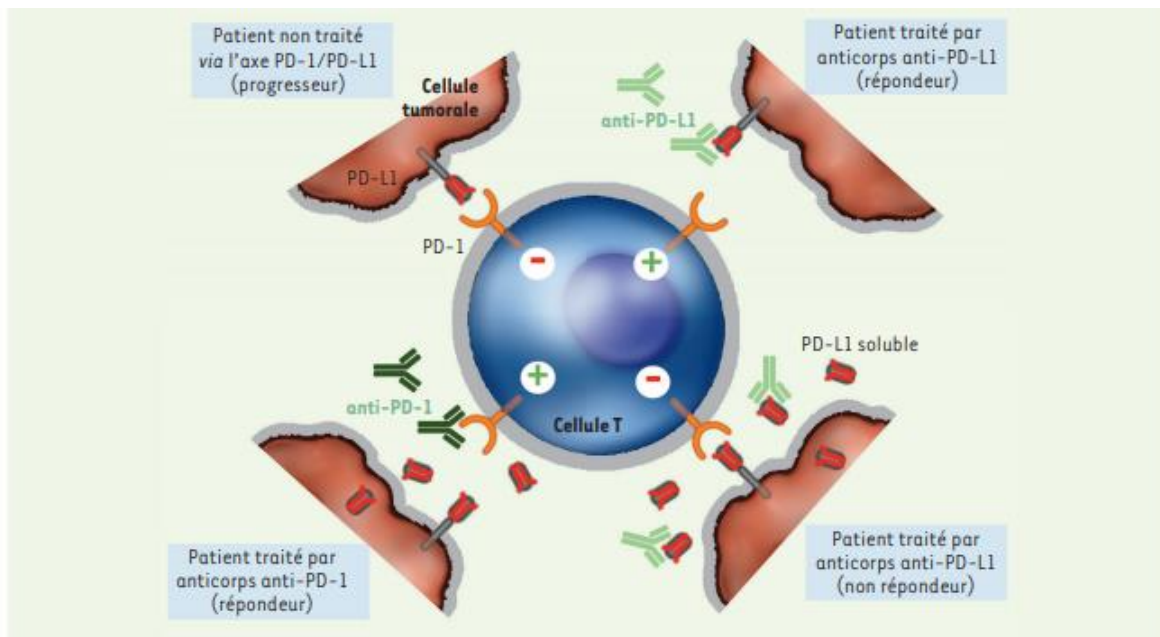


Figure 6.2. Mécanismes d'action des formes solubles de PD-L1 associées au phénomène de résistance des traitements par anticorps anti-PD-L1.

6. CAR T-cells : Une avancée majeure dans l'immunothérapie des leucémies ?

Des lymphocytes T de patients atteints de leucémies B sont prélevées et génétiquement modifiées dont le transgène code pour un récepteur chimérique (CAR).

Ce récepteur reconnaît l'antigène CD19 présents sur les cellules malignes, ce qui permet de les éliminer une fois que les CAR-T réinjectés au patient.

De nombreux essais cliniques de thérapie génique et cellulaire utilisant des lymphocytes anti-tumoraux redirigés sont en cours.

7. Méthodologie et statistique des essais cliniques

a. Définition

Un essai clinique ou étude clinique, ou encore essai thérapeutique, est une étude scientifique effectuée en thérapeutique médicale humaine (volontaires, malades, sains) dans le cadre du développement d'un traitement ou pour évaluer l'efficacité et la tolérance d'une méthode diagnostique. Par exemple, un essai clinique peut avoir comme objectif de tester l'efficacité et l'innocuité d'un nouveau traitement. Afin d'établir l'efficacité et la sécurité d'emploi.

Un essai clinique nécessite d'obtenir une autorisation des agences sanitaires, à savoir l'ANSM (agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). Les patients doivent donner leur consentement éclairé pour participer à une étude clinique.

b. Méthodologie et statistique des essais cliniques

Qualité méthodologique de l'étude, évaluée à quel point les résultats d'une étude sont corrects pour la population étudiée. Divers facteurs peuvent influencer les résultats et l'étude statistique d'un essai clinique, parmi eux :

- Le lieu de l'étude : multicentrique ou mon centrique
- L'échantillonnage : tirage au sort ou randomisation
- Facteur de sélection, performance, mesure, attrition
- La différence systématique entre l'effet mesuré et l'effet réel

c. Méthode d'identification des essais cliniques en cours

Les essais cliniques en cours ont été identifiés dans la base de données ClinicalTrial.gov. Une recherche de toutes les molécules en développement de chaque classe d'immunothérapie spécifique a d'abord été réalisée en utilisant les mots clés suivants : «PD1», «PDL1», «CTLA4», et «CART».

d. Les différentes phases d'un essai clinique

Ce n'est qu'après les multiples étapes du développement pré-clinique que les premiers essais thérapeutiques sur l'homme peuvent être réalisés. On parle alors de développement clinique.

Les essais cliniques sont une étape obligatoire et systématique du développement d'un médicament. Les études cliniques vont permettre de répondre à plusieurs questions essentielles concernant l'utilisation du nouveau médicament testé et de préciser l'effet d'un traitement chez l'homme,

- Des questions de pharmacocinétique sur le devenir du médicament dans le corps humain (absorption, métabolisme, distribution, élimination).

- Des questions de pharmacodynamique du médicament sur l'effet du médicament sur l'organisme qui permettront d'établir ou de vérifier les données thérapeutiques (efficacité et effets indésirables).

On distingue 4 phases dans les essais cliniques :

4.2.1. Phase I

L'essai clinique de phase I sert à déterminer la sûreté d'un médicament chez les êtres humains. Les essais sont, généralement, réalisés chez le volontaire sain. Et des malades (en oncologie) ayant épuisé les ressources thérapeutiques habituelles. Le nombre de sujets varie entre 20 à 80. Ces essais ont lieu dans des centres spécialisés qui ont reçu un agrément de la part des autorités de santé.

Ces études ont deux objectifs majeurs :

1. s'assurer que les résultats concernant la toxicité obtenus lors du développement pré-clinique, sont comparables à ceux obtenus chez l'homme. Cela permet de déterminer :

- la dose maximale tolérée (DMT) du médicament chez l'homme.
- Recherche des effets indésirables en termes quantitatifs et qualitatifs
- Caractérisation de la dose non acceptable
- Proposition de la dose thérapeutique en vue des essais de phase II

2. mesurer, via des études de pharmacocinétique, le devenir du médicament au sein de l'organisme en fonction de son mode d'administration (absorption, diffusion, métabolisme et excrétion).

4.2.2. Phase II

Les essais de phase II est une étude pilote. Cette étude est réalisée sur une population de malades souvent inférieure de 500 sujets. Les objectifs de cette étude est de déterminer :

1. la posologie optimale du produit en terme d'efficacité et de tolérance sur une population limitée et homogène de patients (quelques centaines).

- Toxicité aiguë et cumulative
- Dose et schéma optimal
- Efficacité biologique

2. Les interactions médicamenteuses ainsi que la pharmacocinétique font parfois l'objet d'études dès cette phase.

4.2.3. Phase III

La phase III ou « étude pivot » est l'étude comparative d'efficacité proprement dite et la sécurité d'emploi (bilan efficacité/sécurité). Elle compare le traitement soit à un effet placebo, soit à un traitement de référence. Ces essais, de plus grande envergure, les groupes sont de taille importante, sont conduits sur plusieurs milliers de patients représentatifs de la population de malades à laquelle le traitement est destiné. Il s'agit de programmes extrêmement onéreux. Les objectifs de cette phase :

1. L'objectif scientifique est d'étudier l'impact du traitement sur les fonctions physiologiques chez l'homme. Il s'agit d'essais comparatifs au cours desquels le médicament en développement est comparé à un traitement efficace déjà commercialisé ou, dans certains cas, à un placebo, c'est-à-dire un traitement sans activité pharmacologique.

2. L'objectif pragmatique vise à démontrer :

- l'intérêt thérapeutique du médicament
- Interaction médicamenteuse
- Analyse efficacité et tolérance en sous-groupe
- évaluer son rapport bénéfice/risque.

C'est à l'issue de la phase III que les résultats peuvent être soumis aux Autorités Européennes de Santé (EMA) pour l'obtention de l'autorisation de commercialisation appelée AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

4.2.4. Phase IV

Les essais de phase IV post-marketing sont réalisés une fois le médicament commercialisé, sur un nombre de patients souvent très important (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes). Ils permettent d'approfondir la connaissance du médicament et de faire un suivi à long terme d'un traitement dans les conditions réelles d'utilisation et d'évaluer à grande échelle sa tolérance. Elle doit permettre de dépister des effets secondaires rares ou des complications tardives. Cette phase est à la charge des laboratoires.

Objectifs de cette phase sont :

- La pharmacovigilance permet ainsi de détecter des effets indésirables très rares qui n'ont pu être mis en évidence lors des autres phases d'essai.
- Détermination de la posologie dans des cas particuliers.

- Amélioration de la connaissance du produit.

8. Principes des essais cliniques

Les principes des essais cliniques sont classés

8.1. Principe de comparaison

Consiste à comparer l'amélioration dans un groupe traité à celle dans un groupe contrôle, comparable au groupe traité, qui n'a pas reçu l'intervention à évaluer

Contrôle des facteurs d'amélioration de la maladie autres que l'effet traitement

8.2. Principe de causalité

Les groupes (traités/témoins) doivent absolument être comparables en tous points en dehors du médicament reçu.

8.3. Principe de signification

Toute étude scientifique comparatif nécessite analyse statistique

9. Qualité et réglementaire en biothérapies

En Europe et dans de nombreux pays (États-Unis, Japon, etc.), les données cliniques pouvant être utilisées pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) doivent obligatoirement avoir été obtenues dans des essais obéissant aux bonnes pratiques cliniques. Les données de sécurité précliniques (ou pré-cliniques), c'est-à-dire permettant d'évaluer, sur l'animal, la toxicité potentielle de l'élément testé, doivent quant à elles avoir été obtenues dans des essais obéissant aux bonnes pratiques de laboratoire (arrêté du 14 mars 2000).

Principe d'équipoise clinique : Le clinicien doit proposer, en toutes circonstances, le meilleur traitement possible. Lorsque la communauté médicale ne peut pas déterminer la meilleure option entre deux traitements, il est nécessaire d'envisager une étude clinique randomisée afin de les comparer.

Des critères d'éthique sont indispensables dans tout essai clinique :

- Le respect de l'intégrité physique e morale des participants doit être assuré.
- Les volontaires participants aux études cliniques doivent être informés et donner leur consentement éclairé à l'inclusion dans l'essai. Ils doivent être avertis des risques éventuels de façon exhaustive.

- Les liens financiers entre les investigateurs et les promoteurs de l'étude, quand ils existent, doivent être annoncés. Les conflits d'intérêt doivent être évités.

Sur le plan éthique les essais cliniques sont encadrés par le :

- Le « code de Nuremberg » (1947) : liste de dix critères contenue dans le jugement du procès des médecins de Nuremberg (1946-1947). Ces critères indiquent les conditions que doivent satisfaire les expérimentations pratiquées sur l'être humain pour être considérées comme « acceptables ».
- Déclaration d'Helsinki (1964) de l'Assemblée médicale mondiale.

Chapitre 7 : Les anticorps monoclonaux et polyclonaux

1. De l'exploitation des propriétés immuno-modulatrices des cellules NKT invariantes en immunothérapie

1.1. Les cellules NKT

Les cellules NKT sont des lymphocytes T non conventionnels, vu qu'ils ne reconnaissent pas les molécules du CMH, mais la molécule non polymorphe CD1d. Les lymphocytes NKT sont considérés comme des LT innés ayant un phénotype de cellules activées/effectrices.

Le terme NKT reflète leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles partagées avec des cellules NK, comme l'expression du marqueur NK1.1 ou CD161 chez l'homme.

1.2. Les lymphocytes T et les iNKT

Les lymphocytes NKT sont divisés en trois groupes : NKT invariants (iNKT), NKT de type II et NKT-like, selon l'expression de leur récepteur T (TCR) et leur spécificité antigénique.

- Les LT conventionnels reconnaissent des peptides présentés par le CMH I ou CMH II
- Les lymphocytes NKT expriment un TCR restreint par les molécules non classiques du CMH.
- Les lymphocytes iNKT et NKT de type II sont restreints par la molécule CD1d qui présente des glycolipides ou des sulfatides
- Les cellules T Natural Killer invariantes ou iNKT sont des cellules à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.
- un groupe hétérogène de LT. Ils possèdent des marqueurs de LT et de cellules NK
- La sous-population de NKT restreints au CD1d, la mieux connue exprime une chaîne alpha TCR invariante. On les appelle NKT de type 1 ou iNKT
- Ces cellules sont conservées chez les humains et les souris et sont impliquées dans de nombreux processus immunologiques.

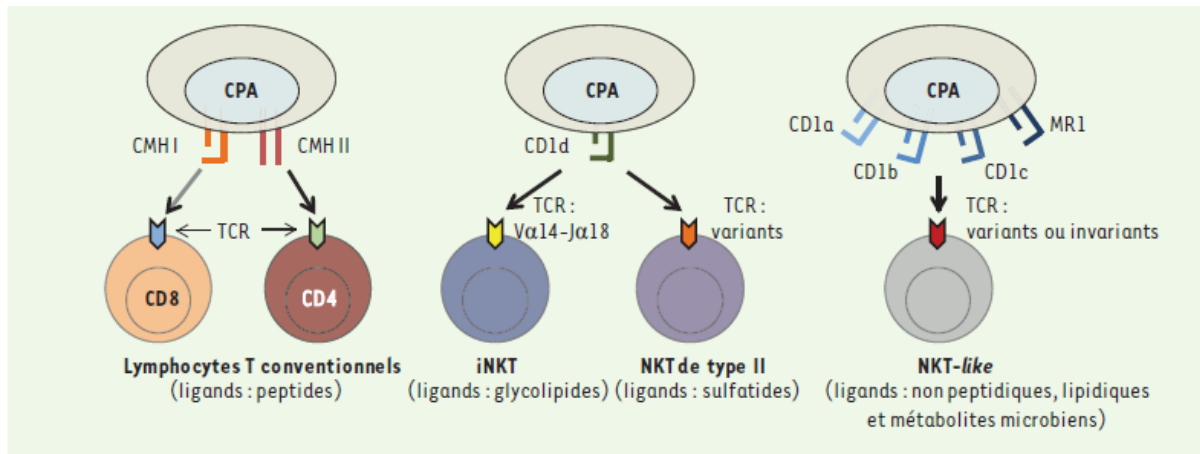


Figure 7.1. Lymphocytes T et lymphocytes NKT.

2. Rôle régulateur des iNKT dans les maladies auto-immunes

2.1. Exemple : Diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune résultant de la destruction des cellules β pancréatiques productrices d'insuline par les cellules du SI.

Cette maladie est caractérisée par la présence d'auto-anticorps et de LT autoréactifs dirigés contre des antigènes produits par les cellules β pancréatiques.

L'étude des mécanismes conduisant à l'apparition de cette pathologie a révélé le rôle crucial des mécanismes de régulation immunitaire.

Parmi les cellules régulatrices, une population particulière, les lymphocytes NKT, pourrait devenir une cible thérapeutique de choix dans la prévention du diabète de type 1.

L'implication des lymphocytes iNKT dans la régulation de maladies auto-immunes a été proposée suite à l'observation d'anomalies de cette population cellulaire chez les patients affectés de cette pathologie.

2.2. Le rôle fonctionnel des cellules iNKT

Le développement du diabète est associé à la présence de lymphocytes T anti-cellules β pancréatiques de type Th1, alors que la protection contre cette pathologie est fréquemment associée à des réponses de type Th2. Bien que les cellules iNKT puissent produire diverses cytokines dont l'IFN γ (interféron γ) et l'IL-4 (interleukine-4), de nombreuses études ont montré que leur production d'IL-4 inhibe les réponses auto-immunes pathogènes de type Th1

Rôle protecteur des cytokines produites par les lymphocytes iNKT. Les iNKT peuvent inhiber le développement du diabète de type 1 par la production de cytokines IL-4 et/ou IL-10. Ces deux cytokines inhibent les réponses Th1 diabétogènes, et l'IL-4 favorise les réponses Th2, non pathogènes dans le diabète.

2.3. Mécanismes de régulation du diabète de type 1 par les lymphocytes iNKT

Au cours de l'induction du diabète, les cellules dendritiques (DC) diabétogènes migrent des îlots pancréatiques vers les ganglions drainant le pancréas (gauche). Dans les ganglions, les DC activent des lymphocytes T naïfs anti-îlots qui deviennent des lymphocytes Th1. Ces derniers migrent vers le pancréas où ils détruisent les cellules β , induisant ainsi le diabète. Toutefois, les lymphocytes iNKT peuvent induire des DC tolérogènes qui favorisent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2, régulateurs ou anergiques (droite). Ces lymphocytes migrent vers le pancréas, mais ne détruisent pas les îlots.

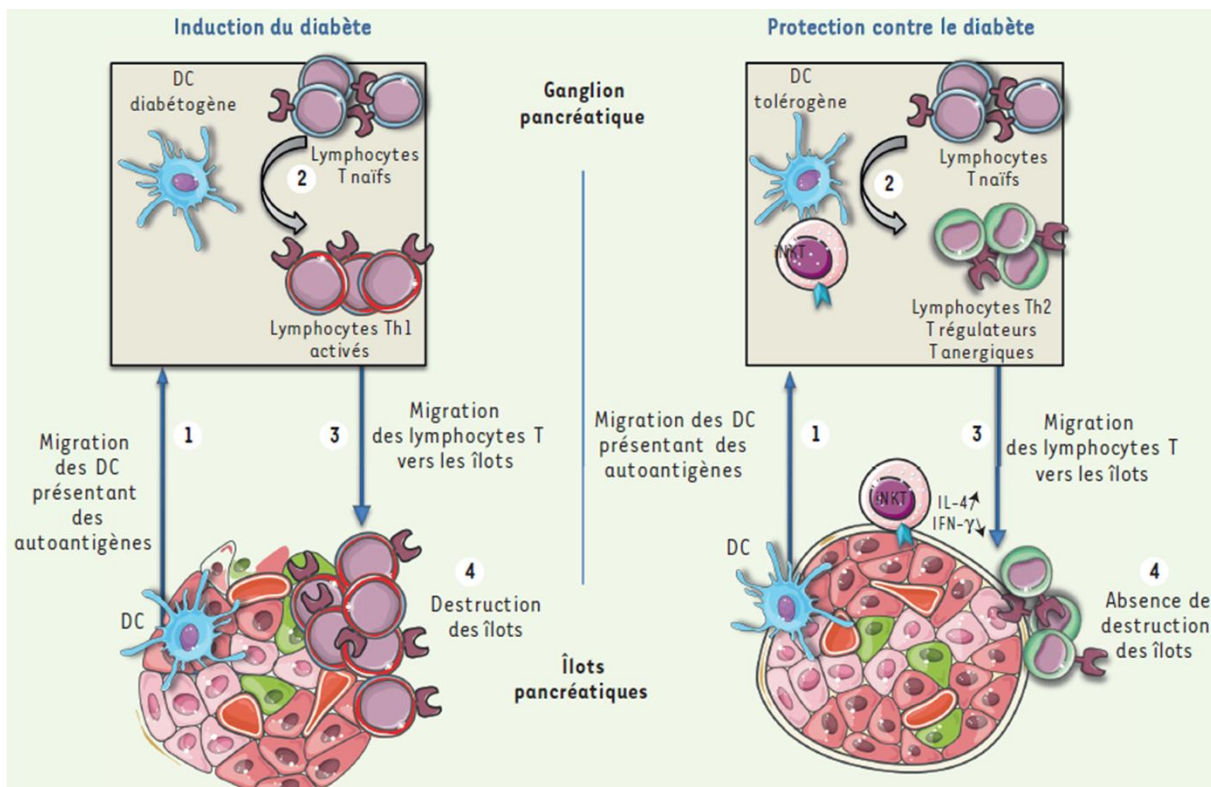


Figure 7.2. Mécanismes de régulation du diabète de type 1 par les lymphocytes iNKT.

2. Physico-chimie des vecteurs non viraux de thérapie génique

2.1. Les vecteurs non viraux de thérapie génique

Un vecteur est un organisme qui ne provoque pas lui-même une maladie mais qui peut la transmettre.

Les agents infectieux peuvent se transmettre verticalement ; c'est-à-dire produire et survivre sur plusieurs générations chez le vecteur et la descendance. C'est grâce à ces vecteurs que nous allons transporter le gène médicament jusqu'à la cellule cible.

Il va permettre de contenir le gène et de l'apporter dans le noyau.

Il existe deux catégories de vecteurs permettant le transfert :

- Les vecteurs viraux : les rétrovirus, es adénovirus el les adeno-associated virus
- Les vecteurs non viraux

2.4. Les vecteurs non viraux de thérapie génique

Le développement d'outils de transfert de gène sur la rationalisation et la synthèse chimique. En contrôlant chacun des composants du vecteur, on cherche à s'affranchir de la complexité, de la reproductibilité difficile et du coût important des préparations obtenues à partir de cellules en culture.

L'immunogénicité indésirable des particules virales est contournée. Tout en cherchant à s'éloigner des virus, la vectorologie non virale s'inspire abondamment des solutions que ceux-ci apportent au problème du transfert de gène. Certains vecteurs de synthèse sont d'une grande efficacité pour modifier des cellules en culture, mais les performances *in vivo* restent à améliorer.

2.4.1. Les liposomes classiques

Les liposomes sont constitués d'un centre aqueux et d'une ou de plusieurs membranes. Le gène d'intérêt insère compacté dans une sphère lipidique composée de deux membranes. Ensuite, l'ADN pénètre par endocytose et en évitant la dégradation extracellulaire. Le liposome se fusionne avec la membrane cellulaire. Et l'ADN atteint le noyau.

Les vecteurs contenant des polymères peuvent être rendus plus spécifiques en leur fixant des ligands qui peuvent reconnaître les protéines étant à la surface de la cellule.

2.4.2. Les vecteurs synthétiques

La pénétration *in vitro* des vecteurs synthétiques dans les cellules ne pose aucun problème, cependant les résultats *in vivo* quant à eux sont très décevants. En effet, il semble qu'une fois injectés par voie intraveineuse, les vecteurs s'agrègent en particules de grande taille qui sont mécaniquement retenues par les poumons et le foie. De plus ce vecteur pose des problèmes de toxicité compte tenu du fait que pour qu'une séquence puisse pénétrer dans le noyau il faut 100 000 molécules d'ADN par cellule cible.

Cependant les défauts des vecteurs synthétiques pourraient être corrigés si l'on faisait d'importants efforts dans le domaine de la chimie et de la biochimie. L'industrie pharmaceutique semble prête à valoriser son savoir-faire professionnel en chimie en étudiant les vecteurs synthétiques. De plus, les retombées pourraient être positives pour leur industrie et pour la thérapie génique.

2.4.3. Les vecteurs plasmidiques ou les plasmides

Des cellules qui vont fabriquer le vecteur à partir de bouts d'ADN double brin appelés plasmides. A l'intérieur de ceux-ci, il y a des informations génétiques précises qui concernent le vecteur et le médicament (gène).

L'ADN plasmidique est utilisé pour le transfert de gène par voie non virale. Il contient une cassette d'expression ainsi que des séquences permettant l'amplification du plasmide grâce aux bactéries.

3. Stratégies vaccinales anti-VIH

3.1. Immunopathologie de l'infection par le VIH

L'infection par le VIH prédispose, de par le déficit immunitaire, qu'il induit à la survenue d'infections dites opportunistes. La caractéristique essentielle du VIH est sa capacité à s'attaquer sur tous les fronts au SI. Ce virus s'attaque aussi bien à l'initiation de la réponse immunitaire par l'infection des cellules présentatrices de l'antigène, qu'à la régulation de cette réponse immunitaire à travers les lymphocytes T CD4+, mais aussi à l'un des bras effecteurs de cette réponse immunitaire, les monocytes macrophages.

Si l'on ajoute à ceci le rôle crucial des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de la réponse humorale et dans le contrôle des réponses cytotoxiques de l'immunité à médiation cellulaire, on s'aperçoit que le VIH s'attaque bien à tous les aspects de la réponse immunitaire.

Il est donc logique de penser que le grand déficit immunitaire observé chez les malades infectés par le VIH résulte donc directement des effets du virus sur le SI.

3.2. Immunopathologie du VIH anomalies des cellules T

3.2.1. Déplétion des lymphocytes CD4

La déplétion des lymphocytes CD4 est observée dès la primo-infection et est corrélée à la progression de la maladie. Cette déplétion est liée soit à l'effet cytopathogène du virus et à la formation de syncytia entre cellules infectées et cellules non infectées, en particulier dans les ganglions où le nombre de cellules est supérieur à celui qui est observé dans le sang,

D'autres font intervenir des mécanismes immunologiques qui sont:

La mort par apoptose ou mort programmée : c'est un processus de suicide cellulaire actif, jouant un rôle important au cours de l'embryogenèse mais aussi au cours de l'établissement de la tolérance au sein du SI.

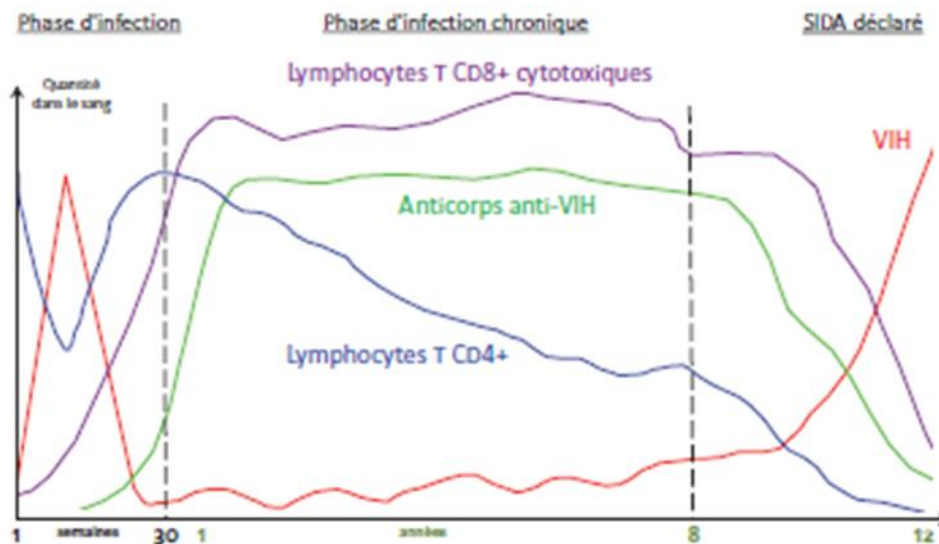


Figure 7.3. Évolution de la lymphopénie T CD4+ et des RI au cours de l'infection naturelle de l'infection par le VIH.

3.2.2. Anomalies fonctionnelles des lymphocytes T

Lymphocytes TCD4+: Les atteintes fonctionnelles des lymphocytes CD4+ sont en partie la conséquence des atteintes quantitatives, elles semblent apparaître précocement au cours de l'infection HIV. L'altération des fonctions TCD4+ se manifeste in vivo par anergie cutanée majeure (HSR) mise en évidence par les tests cutanés à la tuberculine et à la candidine Elle concerne les antigènes vis à vis desquels la plupart des sujets normaux présentent des réactions d'hypersensibilité (anatoxines tétanique et diphtériques, extraits de streptocoque... etc).

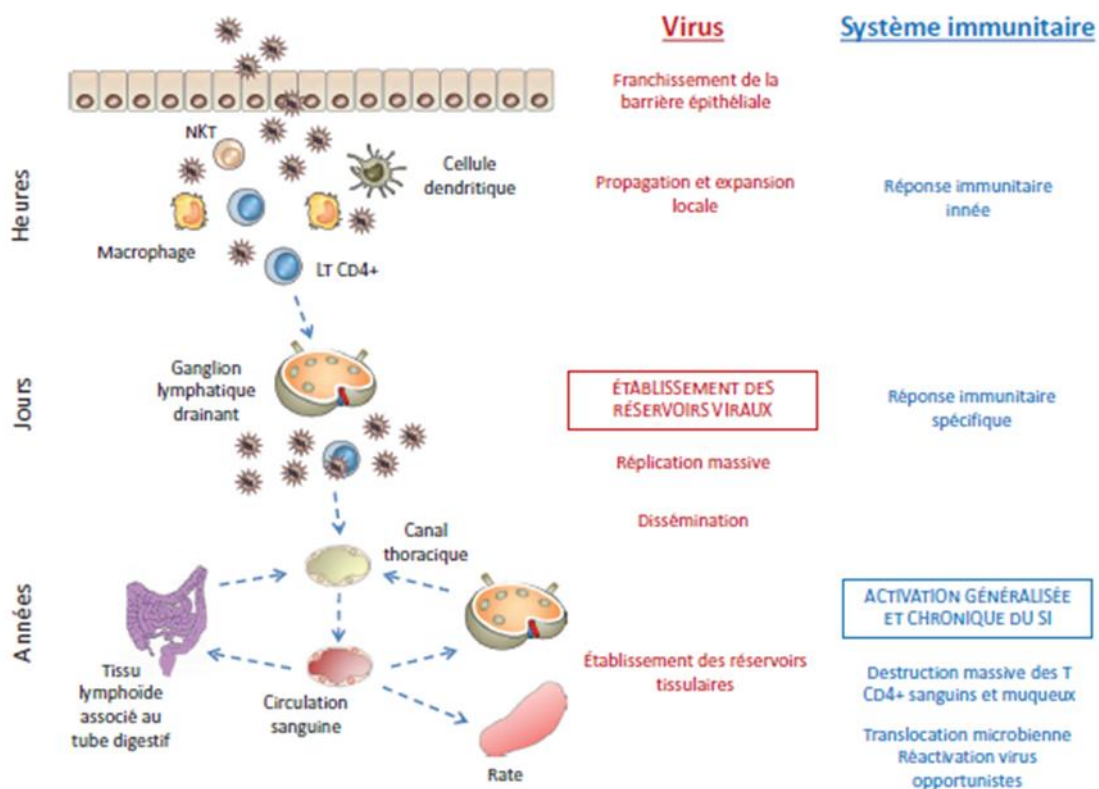


Figure 7.4. Interactions du virus et du système immunitaire en Primo-infection.

3.3. Stratégies vaccinales anti-VIH

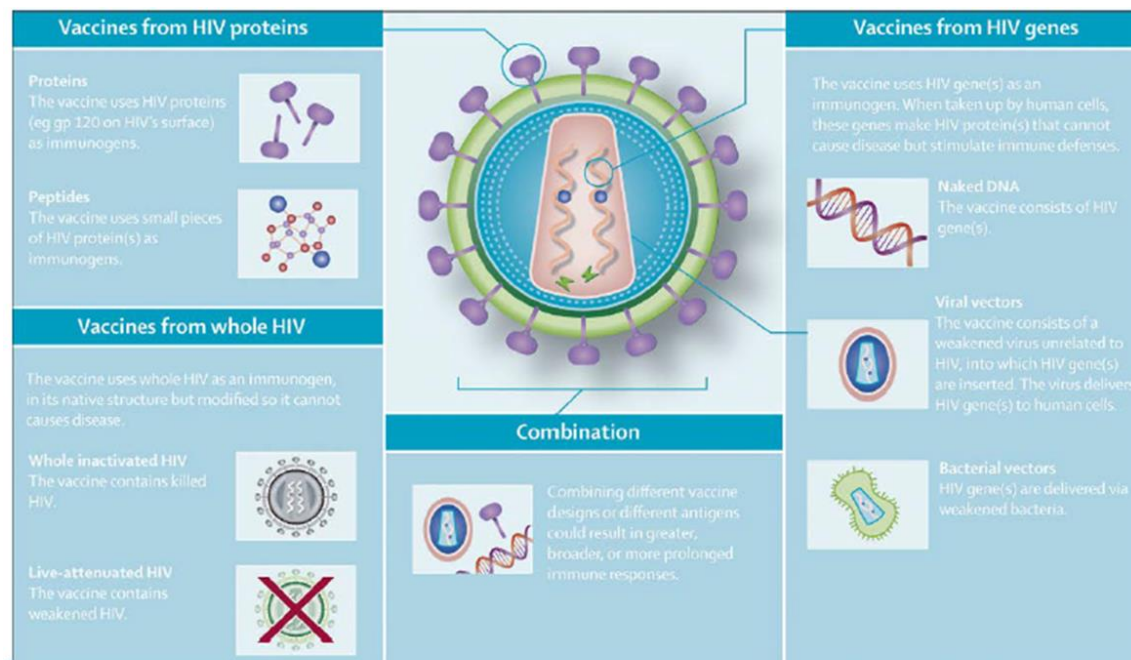
1. Induire une immunité prophylactique

- Variabilité virale
- Difficulté d'obtenir des effecteurs immuns (CTL, Ac) à taux élevés en permanence
- Faible efficacité

3. Amplifier l'immunité à visée thérapeutique sous ART

Pour limiter : la réplication virale lors des arrêts thérapeutique BA VaHIV05

3.3.1. Virosome et application vaccinale anti-VIH



Berkley SF & Koff WC, *Lancet*, 2007, 370 : 94

Figure 7.5. Les différents vaccins anti VIH à l'étude.

3.3.2. Nouvelles stratégies vaccinales contre HIV

Vecteurs Recombinants :

- Pathogènes déjà utilisés chez l'homme comme vaccins « acceptant » la greffe de gènes (recombinés) du VIH et immunisant contre ces antigènes étrangers

ex: poxvirus : canarypox, vaccine atténuée (MVA, NYVAC...)

adénovirus VSV, rougeole, BCG, salmonella, listeria.....

- Partiellement Efficaces chez les macaques /SIV:

Ne bloquent pas l'infection ultérieure par SIV

Freinent l'évolution de la maladie vers le SIDA (SHIV vs SIV)

- Multiples Essais Humains : volontaires sains :

Bonne tolérance

Bonne immunogénicité

4. Design antigénique et vaccination anti-tumorale

4.1. Vaccination anti tumorale

Le but de la vaccination thérapeutique est de stimuler et de diriger le système immunitaire spécifiquement contre les cellules cancéreuses, en lui présentant un antigène tumoral capables de déclencher une réaction immunitaire efficace. Ces vaccins anticancers sont personnalisés et adaptés à la tumeur du patient, selon son profil moléculaire. Plusieurs d'entre eux sont à l'essai, mais un seul est aujourd'hui commercialisé : le Sipuleucel-T, contre le cancer de la prostate. Pour cette approche, il est nécessaire de prélever des cellules dendritiques du patient à partir d'un échantillon sanguin. In vitro, elles sont mises en présence d'un antigène tumoral retrouvé dans 95% des cancers de la prostate (la phosphatase acide prostatique). Réinjectées dans l'organisme du patient, elles présentent cet antigène aux lymphocytes T pour déclencher une réponse cytotoxique contre les cellules cancéreuses. L'opération doit être renouvelée à trois reprises, à deux semaines d'intervalle.

Cette approche nécessite que le système immunitaire ne soit pas "verrouillé" par la tumeur. Si c'est le cas, une association avec un immunomodulateur doit être envisagée pour lever cette inhibition.

La vaccination anti-cancer présente un atout majeur : elle permet de déclencher une réponse immunitaire "mémoire" qui devrait théoriquement protéger le patient contre une rechute.

L'immunothérapie concerne bien d'autres domaines thérapeutiques

L'immunité est impliquée dans le contrôle de nombreuses maladies et l'immunothérapie est déjà utilisée dans plusieurs domaines :

Les maladies infectieuses bien sûr, avec les vaccins préventifs qui consistent à éduquer le système immunitaire pour qu'il soit en mesure de reconnaître et d'éliminer un agent infectieux avant qu'une infection réelle se déclare. Cette vaccination met en jeu les lymphocytes mémoires, qui protègent durablement les personnes vaccinées. En outre, des premiers essais impliquant des immunomodulateurs ont produit des résultats encourageants contre le VIH. Des récepteurs inhibiteurs PD-1 ont en effet été décrits à la surface des lymphocytes T chez les malades du sida, et la levée de cette inhibition par des anticorps anti-PD-1 améliore la réponse antivirale.

Les maladies inflammatoires allergiques ou auto-immunes, correspondant respectivement à la perte de contrôle de la réaction immunitaire en cas d'exposition à un allergène ou à des cellules du soi. Les allergies se traitent déjà par immunothérapie (désensibilisation), en habituant le système immunitaire à tolérer un allergène par administration progressive de ce dernier. Le traitement des maladies auto-immunes fait également appel à une modulation du système immunitaire, grâce à des immunosuppresseurs ou des anticorps monoclonaux (anti-TNF alpha, anti-IL-1, anti-IL-6, anti-IL-12/IL-23...).

Les maladies neurodégénératives, et notamment la maladie d'Alzheimer. Plusieurs essais ont récemment fait appel à des anticorps monoclonaux ou à la vaccination thérapeutique pour favoriser l'élimination du peptide bêta amyloïde, malheureusement sans succès. Mais ses travaux suggèrent un rôle de l'inflammation et de l'immunité dans l'apparition de cette maladie. Cibler le système immunitaire deviendra probablement une nouvelle stratégie pour lutter contre elle.

Tableau 7.1. Antigènes associés aux tumeurs mammaires

Antigène	Spécificité	Type de vaccin
HER2	Famille des récepteurs EGF Surexprimé par 10 à 20 % des cancers du sein	Peptide Protéine ADN Viral
MUC1	Glycoprotéine avec glycosylation altérée sur les cellules tumorales Commun à de nombreux types de cancers (pancréas, poumon, digestif, sein)	ADN
CEA	Surexprimé par les cellules tumorales mais exprimé par les cellules normales Communs à plusieurs types de cancers (colorectal, pancréatique, sein, etc.)	Viral
hTERT	Impliqué dans l'immortalisation cellulaire Exprimé par de nombreux types de cancers	Peptide/DC ADN
Sialyl Tn	Issu de la glycosylation incomplète de la sérine et thréonine Exprimé par de nombreux cancers d'origine épithéliale (estomac, poumon, côlon, sein, œsophage, prostate, endomètre)	Glycoprotéine
Mammaglobuline-A	Exprimé par 40 à 80% des tumeurs mammaires Non exprimé par les cellules normales	ADN

Désensibilisations cutanées

4.2. Les allergies

L'allergie est un dérèglement du SI qui correspond à une perte de la tolérance vis-à-vis de substances a priori inoffensives : les allergènes. Si le nombre de personnes allergiques semble considérablement augmenté depuis plusieurs décennies, il existe aujourd'hui des solutions efficaces pour leur prise en charge, qu'il s'agisse de traitement médicamenteux ou de stratégie de désensibilisation.

Elles peuvent avoir des manifestations cutanées (urticairre, dermatite), respiratoires (rhinite, asthme) ou généralisées (anaphylaxie) et leur prévalence.

4.3. Les mécanismes de l'allergie

L'allergie est un dérèglement du SI qui correspond à une perte de la tolérance vis-à-vis de substances a priori inoffensives : les allergènes.

Pour que l'allergie se déclenche, deux conditions sont nécessaires :

- Une prédisposition génétique,

- Une exposition à la substance allergène.

Les mécanismes à l'origine des maladies allergiques sont de mieux en mieux compris. Les maladies allergiques peuvent être dues aux anticorps et/ou aux LT, des cellules spécialisées du SI. Ainsi, l'eczéma et l'asthme chronique sont causés par des LT. Ces cellules infiltrent la peau et les bronches où elles sont activées par des allergènes eux-mêmes capables d'y pénétrer. Mais, la majorité des allergies sont causées par des anticorps, les IgE. Elles sont dites IgE-dépendantes.

Chez les non allergiques, la fonction normale des IgE est de lutter contre les parasites. Ces anticorps sont couramment fabriqués par le SI. Ils circulent à l'état libre dans le sérum sanguin et sont aussi retrouvés associés à des cellules du système immunitaire particulièrement nombreuses dans la peau, les poumons et le tube digestif : les polynucléaires basophiles et les mastocytes tissulaires. Cela explique la localisation des symptômes allergiques. Lorsqu'un allergène se lie à des IgE associés à une de ces cellules, cette dernière est activée. Elle va alors relarguer des médiateurs chimiques : histamine, tryptase, leucotriènes, prostaglandines... Ces molécules sont responsables des rougeurs, sécrétions et œdèmes observés lors de la réaction allergique.

6.3. La désensibilisation, ou immunothérapie

La désensibilisation ou immunothérapie spécifique agit directement au niveau des lymphocytes T en réorientant la réponse immunologique du patient allergique. La réponse immunologique cellulaire au contact d'un allergène est de 2 types:

La réponse de type 1 correspond au mécanisme en cause dans les maladies inflammatoires et infectieuses avec production d'IgG1 et de lymphocytes cytotoxiques. La réponse de type 2 correspond à celle de l'allergique avec sécrétion de cytokines induisant la production d'IgE par les lymphocytes B. Chez le sujet non allergique la réponse prépondérante est de type 1.

Chez l'allergique le plateau penche fortement du côté des lymphocytes de type 2 : la désensibilisation va réprimer la réponse TH1 et TH2.

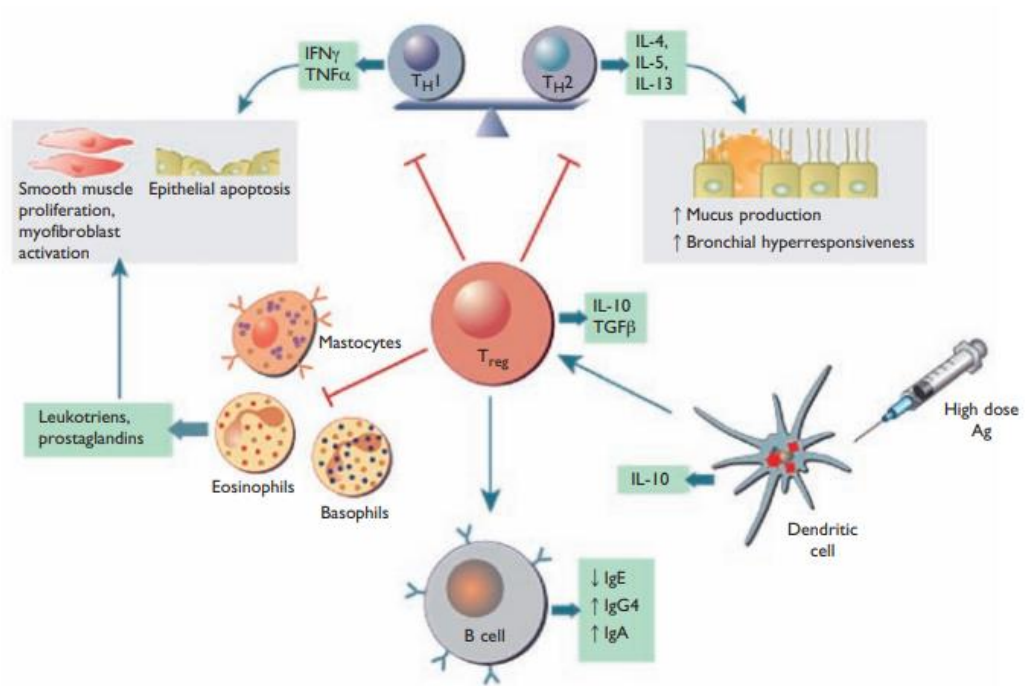


Figure 7.6. Mécanismes impliqués dans l'immunothérapie spécifique.

Chapitre 8: Thérapie génique; Thérapies cellulaire et stratégies vaccinales

1. Electrotransfert : principes et applications à des modèles animaux

L'électrotransfert est une technique de transfert de gène *in vivo*, permettant une expression élevée du transgène dans un grand nombre de tissus. Dans ce contexte, nous avons utilisé l'imagerie optique pour optimiser différents protocoles d'électrotransfert dans le muscle et la peau. Nous avons développé un système de régulation de l'expression des gènes combinant le système de régulation répressible à la tétracycline Tet-Off et une stratégie antisens. Nous avons examiné le potentiel de l'électrotransfert d'ADN plasmidique pour l'obtention d'anticorps neutralisants à haut titre contre les toxines botuliques A, B et E. Les animaux immunisés avec des plasmides codant les fragments immunogènes des toxines expriment de façon endogène ces fragments de toxines, qui servent d'antigènes et déclenchent une réponse immune. Nous avons finalement étudié l'état de méthylation de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert dans le muscle squelettique et sa possible intégration dans le génome.

2. Thérapie cellulaire des hémopathies malignes

2.1. Les cellules CART (Chimeric Antigenic Receptor– T cells)

Le traitement par cellules CAR-T ou CAR-T cells, est une stratégie d'immunothérapie cellulaire en plein développement, qui vise à combattre le cancer en s'appuyant sur le propre système immunitaire du patient.

□ les cellules CAR-T sont des lymphocytes T modifiés génétiquement dans le but de reconnaître puis éliminer les cellules cancéreuses.

2.2. Les différentes générations de CAR.

La 1^{re} génération consiste en une partie du fragment variable d'immunoglobuline (scFv) fusionné à un domaine d'activation CD3 ζ .

La 2^e génération, un domaine de co-stimulation intracellulaire supplémentaire apparaît, habituellement CD28.

Les CAR-T de 3^e génération combinent deux ou plusieurs domaines de co-stimulation.

Les CAR de 4e génération sont construits avec un élément inducible par activation.

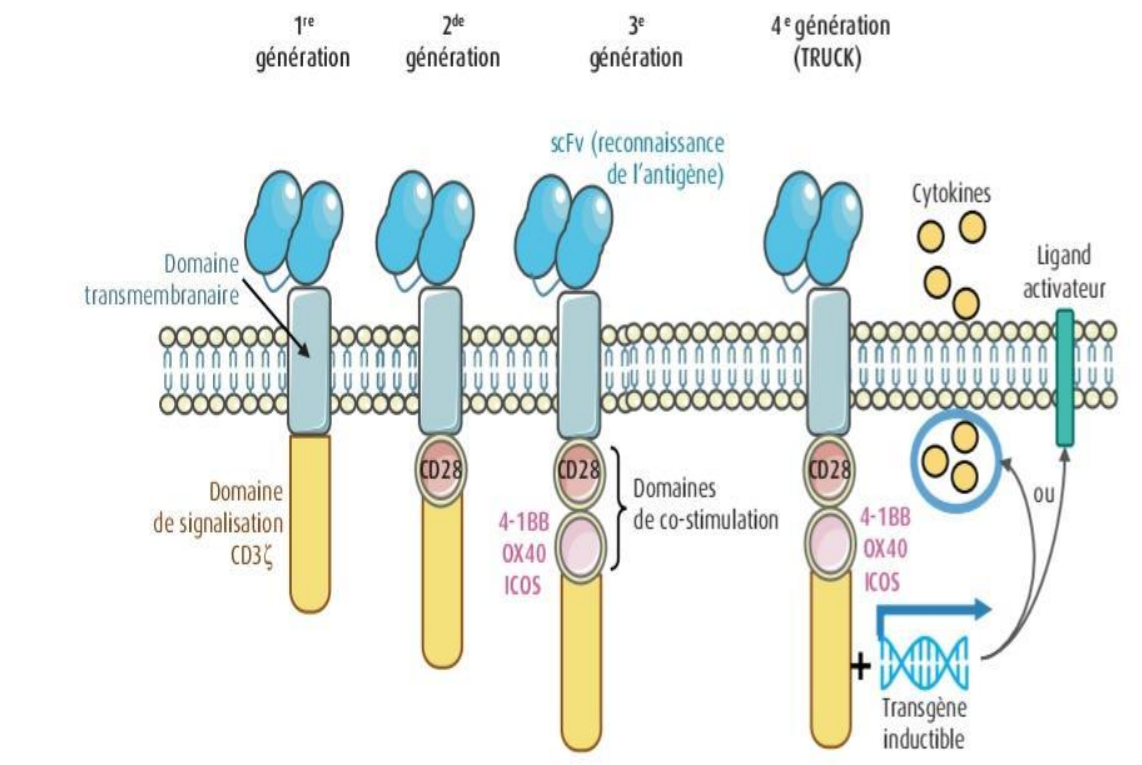


Figure 8.1. Les différentes générations de CAR.

2.3. Lymphocytes T modifiés par transfert de gène

Les TIL et les haTcRT reconnaissent les peptides dérivés des TAA présentés par les cellules tumorales associés à des molécules du CMH I.

Les cellules CAR reconnaissent un antigène présenté par la cellule tumorale par la portion scFv de leur récepteur chimérique.

A. Un des risques des haTcRT est la formation de dimères avec les chaînes des TcR endogènes. Ces dimères peuvent avoir une spécificité pour d'autres antigènes et générer une toxicité.

B. Dans le cas du CAR anti-CD19, la molécule CD19 ciblée est exprimée à la surface des cellules de lymphome B.

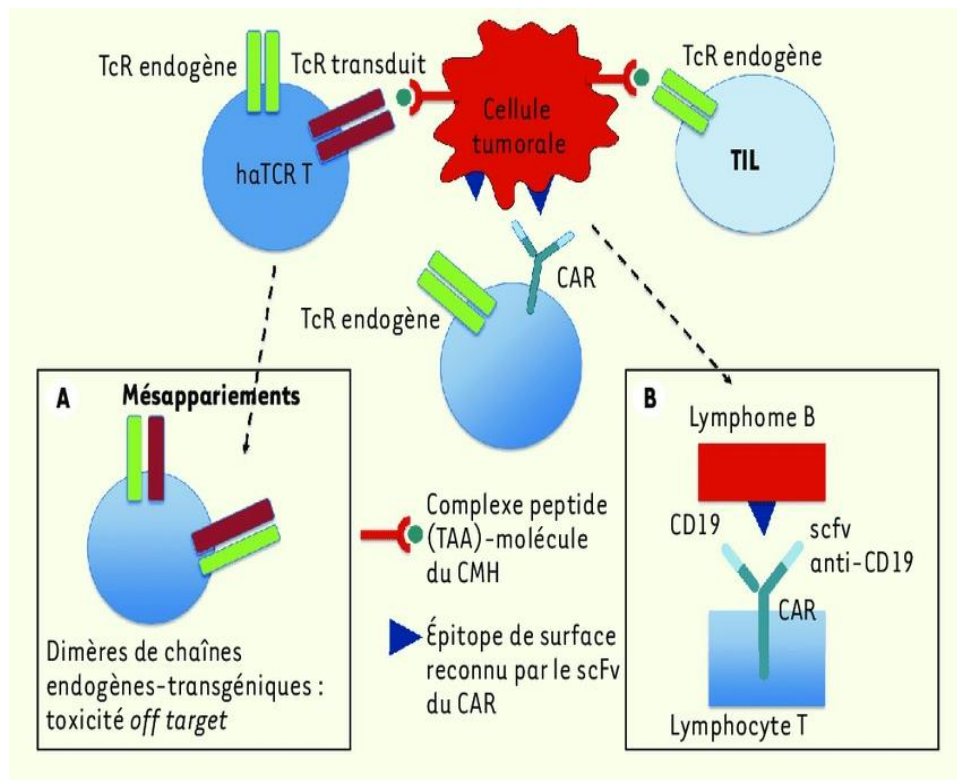


Figure 8.2. Lymphocytes T modifiés par transfert de gène

2.4. Les différents types de système CAR-T cells

KYMRIAH un CAR anti-CD19 destiné à des enfants en échec thérapeutique d'une LAL

YESCARTA pour le traitement de lymphomes non hodgkiniens (LNH) agressifs de l'adulte.

La société Collectis développe, elle, des CAR allogéniques, afin d'éviter le besoin de lymphocytes autologues

Elle met au point des CAR « universels », n'exprimant plus de récepteur T de l'antigène.

(isolés du patient lui-même afin d'éviter tout problème de rejet ou de réaction du greffon contre l'hôte.

Tableau 8.1. Les différents types de système CAR-T

CAR-T	Cible	Indication
Tisagenlecleucel Kymriah™)	CD19	Leucémies aiguës lymphoblastiques de type B Lymphomes B diffus à grandes cellules
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta™)	CD19	lymphome B de haut grade Lymphome primitif à cellules B du médiastin en rechute/réfractaire.
Brexucabtagene autoleucel (Tecartus™)	CD19	Lymphome du manteau en rechute
Isocabtagene maraleucel (ide-cel and bb2121) (Breyanzi™)	BCMA	Lymphomes B diffus à grandes cellules en rechute Myélome multiple en 4ème ligne

2.5. Mode d'activation des lymphocytes T conventionnels et des CAR-T cells

Dans le cadre de la réponse immunitaire adaptative médiée par les LT, l'activation et la prolifération lymphocytaire ne peut être assurée que par l'association de 3 signaux.

D'abord la reconnaissance du complexe antigène/CMH par le TCR (signal 1), puis l'interaction des molécules de co-stimulation (signal 2) et la réception de signaux cytokiniques (signal 3).

Le récepteur chimérique des cellules CAR-T porte l'ensemble des signaux d'activation, via le domaine de signalisation CD3 et l'expression des molécules de co-stimulation.

Ces signaux sont déclenchés dès la reconnaissance directe de la cible antigénique par le fragment variable (scFv) reconnaissant spécifiquement l'antigène cible.

Les signaux de co-stimulation induisent l'activation du lymphocyte CAR-T après reconnaissance de l'antigène conduisant à la production de cytokines et l'expression de

récepteurs de cytokines tel que CD25 sur le CAR-T activé, mimant le signal 3 cytokinique d'activation lymphocytaire T et permettant la prolifération des CAR-T cells.

L'activation des CAR-T cells est amplifiée par la libération de cytokines inflammatoires liée à la lyse tumorale et l'activation des CPA et des monocytes/macrophages (syndrome de relargage cytokinique)

3. Vecteurs oncorétroviraux et lentiviraux recombinants défectifs: applications thérapeutiques

L'utilisation de vecteurs construits à partir des oncorétrovirus avec comme objectif l'expression permanente et/ou ciblée d'un gène d'intérêt dans un organisme a été le plus souvent décevante. En effet, les études réalisées avec ces vecteurs ont montré une inhibition (silencing) de la transcription du gène au cours du développement et/ou de la différenciation. L'espoir renaît grâce aux vecteurs lentiviraux. Ces derniers - capables de transduire des cellules ne se divisant pas - viennent de faire une irruption remarquable dans le domaine de la transgénèse, comme le montrent les travaux récemment publiés. Les auteurs de ces travaux ont en effet obtenu des souris transgéniques pour le gène codant pour la GFP (green fluorescent protein) grâce à l'utilisation de particules lentivirales recombinantes. Ces dernières ont été obtenues après cotransfection dans les cellules 293 d'un vecteur lentiviral, d'un vecteur d'empaquetage et du vecteur VSV-G exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire. Le premier de ces articles montre l'expression de la GFP au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires (ES) murines en corps embryoïdes. De même, la GFP est exprimée dans les tissus des souris nées après transfert dans des blastocystes des cellules ES ainsi transduites. Le deuxième article rapporte que des souris transgéniques pour la GFP ont été obtenues, soit par micro-injection de la suspension virale, concentrée par ultracentrifugation, dans l'espace périvitellin des embryons unicellulaires, soit par incubation de tels embryons, d'abord débarrassés de la zone pellucide, dans cette suspension. Les embryons sont ensuite cultivés pendant 3 jours, puis implantés au stade gastrula ou morula dans des mères porteuses. À la naissance des souriceaux, l'évaluation du nombre de copies du transgène intégré et de l'expression de la GFP indique que les animaux qui expriment la GFP contiennent au moins une copie du transgène et que l'intensité de la fluorescence est positivement corrélée avec le nombre de copies. Si le pourcentage de succès dans l'implantation est significativement plus élevé, lorsque le virus est

transféré par micro-injection que lorsqu'il l'est après incubation, cette dernière approche permet d'établir une corrélation positive entre le nombre d'intégrations provirales et celui des particules infectieuses. Bien entendu, les auteurs ont vérifié que la majorité des animaux (F1) nés du croisement de parents transgéniques expriment la GFP à un niveau égal à celui de ces derniers, ce qui valide l'hypothèse selon laquelle le provirus n'est pas inactivé au cours de la gamétogenèse. Si dans le vecteur lentiviral, le gène de la GFP est placé sous le contrôle d'un promoteur dont l'activité est spécifique d'un tissu, il est alors possible de cibler l'expression du transgène dans ce tissu. Ainsi, la GFP n'est exprimée que dans les cellules du muscle squelettique, quand le transgène est sous le contrôle du promoteur de la myogénine ou dans le thymus, quand son expression dépend du promoteur proximal du gène *lck* spécifique. La transgénèse par vecteur lentiviral, en évitant la micro-manipulation toujours délicate du pronucléus, devrait permettre l'introduction d'un transgène dans les embryons d'autres espèces animales (l'article présente les premiers résultats obtenus chez le rat). De plus, l'incubation des embryons dans la suspension virale propose une approche économique et fiable, facile à mettre en œuvre, et donc accessible à de nombreux laboratoires. Soulignons toutefois que la transgénèse lentivirale reste cependant restreinte à des transgènes de moins de 10 kb.

4. Les déficits immunitaires héréditaires et leurs thérapeutiques

Le système immunitaire est un système biologique de défense contre de nombreuses maladies (maladies infectieuses, maladies auto-immunes, cancers). Pour ce faire, il est composé principalement de cellules et de protéines. Les éléments étrangers à l'organisme sont considérés comme potentiellement agressifs et sont généralement appelés le « non-soi ». Les constituants du système immunitaire ont un rôle dans le repérage de l'« agresseur » du non-soi et vont interagir avec lui. L'organisme met alors tout en œuvre pour limiter l'agression (en éliminant l'antigène en question) et se préparer à la prochaine attaque.

Il y a plusieurs types de protéines dans le système immunitaire qui protègent l'individu : les immunoglobulines (ou anticorps), les protéines du complément et les cytokines. Les protéines du système du complément permettent également la destruction directe de cellules infectées. Les cytokines sont produites par les cellules immunitaires. Il en existe plusieurs dizaines différentes et elles ont toutes un rôle propre. Elles permettent une communication entre les différentes cellules du système immunitaire. Ces deux types de protéines sont identiques chez tous les humains.

Les immunoglobulines sont plus élaborées que les précédentes car toutes différentes les unes des autres et varient d'un individu à l'autre en fonction du type de microbe rencontré. Elles ont pour fonction de se fixer sur les antigènes et de les neutraliser grâce à un complexe antigène-anticorps qui sera facilement repérable par les cellules de l'immunité. Cette reconnaissance permettra de déclencher la réponse du système immunitaire qui conduira à l'élimination de l'antigène.

5. Vecteurs adénovirus en thérapie génique

5.1. Les adénovirus

Les adénovirus C'est une famille regroupant une centaine de variétés mais seulement quarante d'entre elles peuvent entraîner des infections bénignes pour l'homme. Ces virus ont une forme cubique et sont connus en génie génétique pour avoir une forte capacité de transport. Ils ont également un fort taux de multiplication et peuvent infecter un grand nombre de cellules. Le plus connu des adénovirus est le virus du rhume. Ces virus possèdent un ADN double brin.

Les adénovirus, contrairement au rétrovirus, peuvent infecter une cellule même si elle n'est pas en cours de division. Cependant ils ne peuvent pas maintenir leur génome de manière continue au sein de la cellule infectée et donc ne peuvent pas être reproduits lors de la division cellulaire. De plus, ils ne seront pas non plus transmis à la descendance de la cellule et du coup celle-ci se retrouvera vite « engloutie » au milieu des cellules malades qui continueront de se répliquer. Tout cela diminuera alors l'effet du gène thérapeutique. Le manque de stabilité des adénovirus dans la cellule oblige alors à envoyer de fortes concentrations de ces vecteurs viraux qui peuvent être toxiques pour la cellule cible. Ils peuvent également provoquer des réactions immunitaires de l'organisme qui limitera l'administration du vecteur dans la cellule car elle aura créé des anticorps la rendant immunisée.

5.2. Les adeno-associated virus (AAV)

Les AAV sont des virus non pathogènes qui sont très répandus chez l'homme. Ils ne peuvent contenir que de petites séquences d'ADN et ils ne peuvent pas fonctionner seuls. En effet, ils peuvent se répliquer uniquement en s'associant à des adénovirus ou au virus de l'herpès. Ils ont la capacité de transduire efficacement certaines cellules comme les cellules

du foie, du cerveau ou encore certaines cellules du sang. De plus, tels les adénovirus, ils peuvent également infecter une cellule qui n'est pas en cours de mitose.

Cependant, le problème qui se pose est que cette capacité disparaît une fois que le génome de l'AAV est modifié par l'introduction du gène médicament. Malheureusement, même si les vecteurs peuvent toujours infecter les cellules, ils ne peuvent plus s'intégrer dans le génome de celles-ci.

Ces AAV sont un bon espoir car ils pourront donner des vecteurs peu dangereux présentant certains avantages mais ils sont encore inexploitablement dans certaines cliniques.

Un vecteur viral doit avoir une capsid identique à celle du virus de départ, mais dont le génome a été modifié pour contenir le gène médicament. On parle alors de génome « recombinant ». Pour le modifier, on sépare tout simplement une séquence spécifique du virus des autres restantes pour pouvoir l'introduire dans la cellule cible. Une fois dans la cellule, il va produire une capsid sans génome : une cellule d'emballage dans laquelle on va introduire le génome. Celui-ci est créé par les autres séquences du virus dans lesquelles on greffe le gène thérapeutique. Une fois le génome introduit dans la cellule, celles-ci donnent naissance au vecteur. Chaque type de vecteur viral peut être modifié de telle sorte qu'il assure le ciblage des particules vers des récepteurs particuliers ou pour inclure des systèmes d'expression de gènes divers et variés. Cependant ces vecteurs viraux ont quand même quelques inconvénients : ils sont difficiles à produire, ils ne peuvent pas contenir d'ADN de grande taille et ils peuvent induire des réactions immunitaires.

7.3. Application en thérapie génique

Exemple, un vecteur de type adénovirus, nous devons associer trois plasmides différents : l'un permettant de construire la capsid, l'autre portant les gènes responsables de la multiplication et le dernier pouvant transporter le gène médicament. Bien évidemment chaque plasmide choisi est spécifique à la cellule qu'on veut utiliser. De plus, chaque plasmide peut agir dans des cellules particulières sans endommager les autres. Le plasmide le plus complexe à réaliser des trois est celui contenant le gène thérapeutique car il faut d'abord le prélever dans l'ADN de cellules puis l'introduire dans un autre plasmide appelé « cassette d'expression ». Cette cassette d'expression contient toutes les informations nécessaires pour transcrire le gène médicament. Tels les plasmides, elles aussi sont spécifiques à un type de cellules particulier.

Différentes enzymes servant de protéines dites « ciseaux » permettent de les repérer ainsi que de les couper pour qu'elles soient ensuite collées au gène thérapeutique grâce à d'autres enzymes.

Une fois le plasmide créé dans les bactéries afin de pouvoir les conserver, puis on place ces bactéries en présence d'un antibiotique qui permettra alors de détruire uniquement les bactéries ne contenant pas le plasmide et donc n'étant pas protégé par celui-ci. Grâce à cette méthode, il ne restera plus que les bactéries dites « bonnes » qui seront remises en culture pour qu'elles puissent se reproduire et ainsi en obtenir une quantité suffisante qui nous permettra par la suite de fabriquer le vecteur du gène thérapeutique. Une fois tout cela réalisé, et une fois que nous avons assez de bactéries, on va les couper pour pouvoir récupérer le plasmide du vecteur et le vecteur du gène médicament. On va ensuite mettre ces plasmides en contact avec des cellules qui, tout naturellement, vont lire leurs informations et les traduire comme si c'étaient leurs propres gènes qu'elles même auraient créé. Ce sont ces mêmes cellules qui vont créer les vecteurs viraux contenant le gène médicament qui ensuite rentreront dans d'autres cellules afin de les infecter tel un véritable virus naturel.

6. Cellules dendritiques et applications thérapeutiques

Différents protocoles permettent d'obtenir in vitro des CD: Trois grands modèles de génération de cellules dendritiques in vitro ont été décrits:

6.1. La génération des cellules de Langerhan

Les cellules de Langerhans sont générées par un précurseur hématopoïétique (de la moelle osseuse) CD34+. Ce précurseur est en fait capable de se différencier soit vers un phénotype de CD lymphoïdes soit vers un phénotype de cellules de Langerhans selon l'environnement moléculaire.

6.2. La génération des CD plasmatoïdes

Ces CD sont générées par un précurseur CD34+. In vitro elles se différencient rapidement en CD plasmatoïdes matures.

6.3. La génération de CD myéloïdes à partir de monocytes

les monocytes (en présence de GM-CSF et d'IL-4) génèrent des CD myéloïdes immatures . Ce mode d'obtention de CD est le plus communément utilisé car les monocytes sont faciles à récupérer dans le sang.

7. Les outils: techniques avancées de cytométrie

7.1. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes..)

Les caractéristiques individuelles de chaque particule telle que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent.

7.2. Principe de la cytométrie en flux

Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceaux laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que:

La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules.

La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.

7.3. Application

Analyses morphologiques, fonctionnelles, Analyses antigéniques, expression des protéines

La Viabilité, la Prolifération, le Cycle cellulaire et l'apoptose et le Tri cellulaire

Reference bibliographique

- Bleul, C.C., Schultze, J.L., and Springer, T.A. (1998). B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J. Exp. Med.* *187*, 753–762.
- Boelens, J., Philippé, J., and Offner, F. (2007). B-CLL cells from lymph nodes express higher ZAP-70 levels than B-CLL cells from peripheral blood. *Leuk. Res.* *31*, 719–720.
- Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E., and Brooks, A.G. (1998). Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* *187*, 813–818.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O’Callaghan, C.A., Söderström, K., D’Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., et al. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* *391*, 795–799.
- Breuning, M.H., Berg-Loonen, E.M. van den, Bernini, L.F., Bijlsma, J.B., Loghem, E. van, Khan, P.M., and Nijenhuis, L.E. (1977). Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. *Hum. Genet.* *37*, 131–139.
- Catera, R., Silverman, G.J., Hatzi, K., Seiler, T., Didier, S., Zhang, L., Hervé, M., Meffre, E., Oscier, D.G., Vlassara, H., et al. (2008). Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol. Med. Camb. Mass* *14*, 665–674.
- Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 4609–4614.
- Chen, L., Apgar, J., Huynh, L., Dicker, F., Giago-McGahan, T., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2005). ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *105*, 2036–2041.
- Chen, L., Huynh, L., Apgar, J., Tang, L., Rassenti, L., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2008). ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *111*, 2685–2692.
- Chiorazzi, N., Hatzi, K., and Albesiano, E. (2005). B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1062*, 1–12.

Cragg, M.S., Chan, H.T.C., Fox, M.D., Tutt, A., Smith, A., Oscier, D.G., Hamblin, T.J., and Glennie, M.J. (2002). The alternative transcript of CD79b is overexpressed in B-CLL and inhibits signaling for apoptosis. *Blood* 100, 3068–3076.

Deaglio, S., Capobianco, A., Bergui, L., Dürig, J., Morabito, F., Dührsen, U., and Malavasi, F. (2003). CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 102, 2146–2155.

Dühren-von Minden, M., Übelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M.P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Köhler, F., et al. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 489, 309–312.

Eeva, J., and Pelkonen, J. (2004). Mechanisms of B cell receptor induced apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 9, 525–531.

Efremov, D.G., Gobessi, S., and Longo, P.G. (2007). Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun. Rev.* 7, 102–108.

Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229, 152–172.

Elmer, B.M., and McAllister, A.K. (2012). Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends Neurosci.* 35, 660–670.

Fong, D.C., Brauweiler, A., Minskoff, S.A., Bruhns, P., Tamir, I., Mellman, I., Dairon, M., and Cambier, J.C. (2000). Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 4453–4462.

Francke, U., and Pellegrino, M.A. (1977). Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1147–1151.

Fruman, D.A., Satterthwaite, A.B., and Witte, O.N. (2000). Xid-like phenotypes: a B cell signalosome takes shape. *Immunity* 13, 1–3.

Giachino, C., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). kappa+lambda+ dual receptor B cells are present in the human peripheral repertoire. *J. Exp. Med.* 181, 1245–1250.

Guipaud, O., Deriano, L., Salin, H., Vallat, L., Sabatier, L., Merle-Béral, H., and Delic, J. (2003). B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol.* *4*, 505–514.

Healy, J.I., Dolmetsch, R.E., Timmerman, L.A., Cyster, J.G., Thomas, M.L., Crabtree, G.R., Lewis, R.S., and Goodnow, C.C. (1997). Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity* *6*, 419–428.

Herling, M., Patel, K.A., Weit, N., Lilienthal, N., Hallek, M., Keating, M.J., and Jones, D. (2009). High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *114*, 4675–4686.

Hippen, K.L., Buhl, A.M., D'Ambrosio, D., Nakamura, K., Persin, C., and Cambier, J.C. (1997). Fc gammaRIIB1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation. *Immunity* *7*, 49–58.

Houlston, R.S., Sellick, G., Yuille, M., Matutes, E., and Catovsky, D. (2003). Causation of chronic lymphocytic leukemia—insights from familial disease. *Leuk. Res.* *27*, 871–876.

Jumaa, H., Hendriks, R.W., and Reth, M. (2005). B cell signaling and tumorigenesis. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 415–445.

Jun, J.E., and Goodnow, C.C. (2003). Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat. Immunol.* *4*, 1057–1064.

Karray, S., Merle-Béral, H., Vazquez, A., Gerard, J.P., Debre, P., and Galanaud, P. (1987). Functional heterogeneity of B-CLL lymphocytes: dissociated responsiveness to growth factors and distinct requirements for a first activation signal. *Blood* *70*, 1105–1110.

Kater, A.P., Evers, L.M., Remmerswaal, E.B.M., Jaspers, A., Oosterwijk, M.F., van Lier, R.A.W., van Oers, M.H.J., and Eldering, E. (2004). CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack. *Br. J. Haematol.* *127*, 404–415.

Lanham, S., Hamblin, T., Oscier, D., Ibbotson, R., Stevenson, F., and Packham, G. (2003). Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *101*, 1087–1093.

- Minuzzo, S., Indraccolo, S., Tosello, V., Piovan, E., Cabrelle, A., Trentin, L., Semenzato, G., and Amadori, A. (2005). CD40 activation of B-CLL cells is associated with augmented intracellular levels of CD79b and increased BCR expression in a subset of patients. *Leukemia* *19*, 1099–1101.
- Morton, C.C., Kirsch, I.R., Nance, W.E., Evans, G.A., Korman, A.J., and Strominger, J.L. (1984). Orientation of loci within the human major histocompatibility complex by chromosomal in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 2816–2820.
- Nédellec, S., Renaudineau, Y., Bordron, A., Berthou, C., Porakishvili, N., Lydyard, P.M., Pers, J.-O., and Youinou, P. (2005). B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3749–3756.
- Niir, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 945–956.
- Payelle-Brogard, B., Magnac, C., Alcover, A., Roux, P., and Dighiero, G. (2002). Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* *118*, 976–985.
- Perrot, A., Pionneau, C., Nadaud, S., Davi, F., Leblond, V., Jacob, F., Merle-Béral, H., Herbrecht, R., Béné, M.-C., Gribben, J.G., et al. (2011). A unique proteomic profile on surface IgM ligation in unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *118*, e1-15.
- Pers, J.O., Berthou, C., Porakishvili, N., Burdjanadze, M., Le Calvez, G., Abgrall, J.F., Lydyard, P.M., Youinou, P., and Jamin, C. (2002). CD5-induced apoptosis of B cells in some patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* *16*, 44–52.
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lin-Lee, Y.-C., and Ford, R.J. (2005). Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* *106*, 3940–3947.
- Raff, M.C., Sternberg, M., and Taylor, R.B. (1970). Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature* *225*, 553–554.
- Schattner, E.J., Mascarenhas, J., Reyfman, I., Koshy, M., Woo, C., Friedman, S.M., and Crow, M.K. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity. *Blood* *91*, 2689–2697.

Smith, S.H., and Reth, M. (2004). Perspectives on the nature of BCR-mediated survival signals. *Mol. Cell* 14, 696–697.

The MHC sequencing Consortium (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401, 921–923.

Trowsdale, J. (2011). The MHC, disease and selection. *Immunol. Lett.* 137, 1–8.

Vallat, L.D., Park, Y., Li, C., and Gribben, J.G. (2007). Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* 109, 3989–3997.

Vuillier, F., Dumas, G., Magnac, C., Prevost, M.-C., Lalanne, A.I., Oppezzo, P., Melanitou, E., Dighiero, G., and Payelle-Brogard, B. (2005). Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood* 105, 2933–2940.

Willimott, S., Baou, M., Huf, S., Deaglio, S., and Wagner, S.D. (2007). Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4. *Haematologica* 92, 1359–1366.

Woyach, J.A., Johnson, A.J., and Byrd, J.C. (2012). The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 120, 1175–1184.

Zhang, S., and Kipps, T.J. (2014). The Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 103–118.

Zupo, S., Isnardi, L., Megna, M., Massara, R., Malavasi, F., Dono, M., Cosulich, E., and Ferrarini, M. (1996). CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 88, 1365–1374.

RMS_idPAS_D_ISBN_pu2011-15s_sa04_art04.pdf.

Julien Gaillard., Pierre-Alexandre., Bart Annette., Leimgruber François Spertini., (2011). Désensibilisation : vers de nouvelles perspectives. *Revue médicale suisse Rev Med Suisse* 2011 ; 7 : 850-5