

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

DES Biologie Médicale
Cambodge - septembre 2009

CM4.2
Activation lymphocytaire B

Bertrand Bellier
UPMC CNRS
Immunology Immunopathology Immunotherapy
Pôle-Salpêtrière - Paris - France
bertrand.bellier@upmc.fr


Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Plan

- **I. Intro: rappel sur Anticorps et Lymphocytes B**
 - Structure des Ig
 - Diversité isotypique et idiotypique
 - Origine de la diversité
- **II. Stimulation antigénique des LyB et mise en place de la réponse humorale**
 - Nature des antigènes (thymo-dépendent/ indépendant)
 - Coopération cellulaire
 - La réponse germinative:
 - maturation d'affinité
 - commutation de classe
 - Cellules mémoire
- **III. Echappement des micro-organismes à la réponse anticorps**

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

I. Rappels:

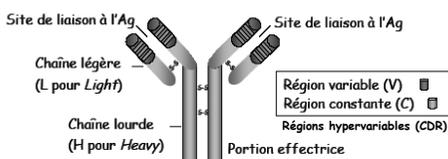
Anticorps : Structure, Diversité, Origine

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Anticorps et Réponse humorale

- **Anticorps : protéines sériques, du groupe des gammaglobulines, aussi appelées immunoglobulines ou Ig soluble**
- **Sécrétés après recrutement, activation et différenciation en plasmocytes des lymphocytes B suite au contact Antigène - Récepteur membranaire (BCR ou Ig membranaire)**



Molécule hétérodimérique
4 chaînes polypeptidiques :
• 2x (H : 50 Kda)
• 2x (L : 22 Kda)

Liaison disulfure intrachaine
Formation de domaines de type « Ig »
• 110 AA
• Repliement en feuillets plissés Beta



Lymphocyte B

- BCR est responsable de la reconnaissance de l'antigène
- Les chaînes intracellulaires Iga-Igb assurent la transmission du signal

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Classes d'Immunoglobulines

- Variabilité de la partie constante = VARIABILITÉ ISOTYPIQUE
- L'isotype est défini d'après la chaîne lourde
- 5 Classes d'Ig: M (μ), D (δ), G (γ), A (α), E (ϵ)
- Sous-classes pour IgG et IgA (variabilité allotypique)
- Propriétés fonctionnelles spécifiques

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Reconnaissance antigénique Variabilité idiotypique

- Reconnaissance et fixation directe de l'Ag par le BCR au niveau de la région variable
- Chaque lymphocyte B exprime un récepteur de spécificité unique
- Grande diversité de spécificité (10^{13} régions variables différentes en théorie)
- L'ensemble des cellules B produits définit le RÉPERTOIRE PRIMAIRE (Diversité répertoire = diversité de la spécificité antigénique)
- Seules les cellules exprimant le récepteur approprié pourront lier avec une grande affinité un antigène particulier (recrutement) et ainsi s'activer =SELECTION CLONALE

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Diversité de la spécificité antigénique: origine génétique

- La région V est formée par l'association de segments génétiques.
- Les régions V sont composées de segments: V, D, J ou V, J
- H, L: loci génétiques différents (H, K, L: chromosome 14, 2, 22)

La chaîne H est codée par les gènes d'un seul locus génique (chromosome 14)
La chaîne L peut être codée par les gènes de deux locus génétiques distincts κ ou λ (sur les chromosomes 2 et 22)

Origine de la diversité:
• Diversité combinatoire
• Diversité jonctionnelle
• Hypermutation

• Cf cours « Imm Fonda »

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Domaines de liaison à l'Ag

- Site de fixation défini par des séquences hypervariables au sein de la région variable
- 3 Zones hypervariables: CDR1, 2, 3 dans chaque région V
- CDR= Complementary Determining Region:
- Entre les CDR se trouvent les régions charpentes (Framework Regions): FR1 -4 q présentent peu de variabilité

La séquence des régions V est plus variable au niveau des CDR

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Liaison antigénique

- Interactions entre les acides aminés (AA) des CDR (paratope) et l'antigène (épitope)
- Complémentarité de conformation entre épitope et paratope
- Epitopes linéaires ou continus: AA juxtaposés dans la structure primaire
- Epitopes conformationnels ou discontinus : composés d'AA éloignés dans la structure primaire mais regroupés dans la protéine)

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Diversité du répertoire et Immunodominance

- La large diversité du répertoire autorise l'établissement d'une réponse contre la plupart des antigènes / des micro-organismes = Immunocompétence
- Les protéines possèdent généralement de nombreux épitopes potentiels
- Cependant, les réponses s'établissent contre seulement certains épitopes = Notion d'Immunodominance
- Mécanismes de l'Immunodominance:
 - Compétition entre les différents BCR reconnaissant les épitopes présents
 - Compétition homéostatique des LyB activés
- Conséquences en vaccination

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Non-réponse: Absence de sélection clonale

- Non-répondeur
- Peu fréquent dans le cadre d'infection par micro-organismes
- Eventuellement si nombre d'antigènes est limité:
 - Protéines
 - Cas des vaccins sous-unitaires: 10% des sujets vaccinés HBs
- Plus fréquemment l'état de non-répondeur est lié à des déficits immunitaires plus sévères ou des trous dans répertoire T

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Cas des déficits immunitaires « B » Importance des anticorps dans la lutte microbienne

- Déficits immunitaires B :
 - Inné : Déficit génétique; ex: maladie de Bruton = Agammaglobulinémie congénitale (Défaut Tyr Kinase)
 - Acquis: Au cours du myélome multiple, de certaines leucémies (leucémie myéloïde chronique), de pathologies liées aux immunoglobulines (gammopathie).
- Infections opportunistes
 - Infections bactériennes : +++
 - Streptocoque, Méningocoque, Haemophilus et Giardia, Pseudomonas, Proteus, Serratia, Nocardia
 - Infections virales:
 - Infections respiratoires
 - Immunothérapie par IVIG hyperimmunes
 - Infections parasitaires : giardiases

XLA: Maladie de Bruton ou Agammaglobulinémie liée à l'X due à des mutations du gène BTK (Xid chez la souris)
HIGM1: Hyperimmunoglobulinémie liée à l'X (syndrome d'hyper-IgM lié à l'X) due à des mutations du gène CD40L.

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

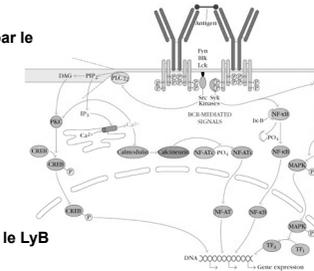
II. Stimulation antigénique et mise en place de la réponse humorale

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Sélection et activation des lymphocytes B

- Reconnaissance directe de l'épitope par le BCR
- Pontage des BCR
- Transduction signal
- Antigène = 1er signal
- Généralement insuffisant pour activer le LyB
- Nécessité d'un « help » à l'exception de certains Ag
 - Ag Thymo-indépendants
 - Activation indépendante des LyT helper
 - Ag Thymo-dépendants
 - Activation dépendante des LyT helper

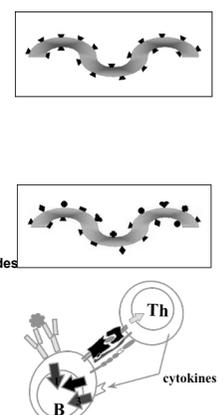


Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Cas des antigènes thymo-indépendants

- **Ag Thymo-indépendants**
 - sont classiquement des substances polymériques.
 - 2 types:
 - Type 1: Sucres
=mitogènes: Activateurs polyclonaux (indépendant de la spécificité antigénique).
Ex: Lipopolysaccharide (LPS) de paroi des bactérie Gram
 - Type 2: Protéines multivalentes
=molécules présentant des motifs répétitifs.
Ex: flagelline bactérienne
- **Ag Thymo-dépendants**
 - Antigènes protéiques solubles (peu de répétition des déterminants antigéniques)
 - Activation nécessite l'aide des LyT :
 - Interactions moléculaires
 - Surface des LyT CD4 activés
= signal 2
 - Cytokines
 - Sécrétées par LyT CD4 activés
= signal 3

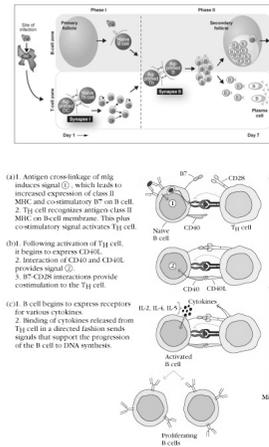


Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Signaux requis pour l'activation des LyB thymo-dépendants

- 3 signaux:
 - Signal 1: BCR + Ag
= signaux de compétence
 - Signal 2 : Interaction entre LyB-LyT
 - Présentation des Ag par LyB pré-activé
 - Interaction moléculaire avec molécule de co-stimulation des LyT helper
 - Signal 3: Cytokines
 - Stimule la prolifération
= signaux de progression
 - Détermine la différenciation des Ly B naifs en LyB effecteurs
- Résultats:
 - Prolifération extra-folliculaire et différenciation en plasmocytes à courte durée-vie sécrétant des anticorps de faible affinité d'isotype IgM



Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Centres germinatifs

–Interaction CD40-CD40L déclenche la formation d'un centre germinatif lieu de:

- **maturation d'affinité**
- **commutation de classe**
- **formation de plasmocytes et des cellules mémoire**

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Différenciation des cellules B Maturation d'affinité

- **Affinité des AC augmente de 100 à 1000 fois au cours de la réponse primaire**
- **Hypermutation somatique:**
 - Exclusivement au niveau des centres germinatifs
 - Mutation intense des régions variables des chaînes lourdes et légères
 - 10-3/paire de base/ division (>>10-9)
 - Mutations ponctuelles dans région proche des segments V(D)J = CDR1, CDR2
 - V(D)J = 700pb: après 2 divisions presque tous les centroblastes sont mutés
 - Modification éventuelle de:
 - L'Affinité
 - La Spécificité
 - Pas d'altération de la région C (Fonction)
- **Requiert la sélection des nouveaux clones en présence des FDC (cellules folliculaire dendritiques) présentant à leur surface des complexes Ag-AC**

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Différenciation des cellules B Commutation de classe

- **Mécanisme: Association du domaine VH réarrangé(VDJ) avec une nouvelle région constante**
- **Conséquences:**
 - Ne change pas la spécificité antigénique
 - Changement de l'isotype de la partie Fc = nouvelles fonctions biologiques
- **Initiée suite à l'interaction CD40/CD40L**
– Cf syndrome hyper IgM

Syndrome Hyper-IgM

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Commutation de classe: influence des cytokines

Cytokine	IgM	IgG3	IgG1	IgG2b	IgG2a	IgA	IgE
IL-4	Inhibits	Inhibits	Induces	Inhibits	Inhibits	Inhibits	Induces
IL-5							Augments production
IFN-γ	Inhibits	Induces	Inhibits	Inhibits	Inhibits	Inhibits	Inhibits
TGF-β	Inhibits	Inhibits		Induces	Induces	Induces	Induces

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Influence du micro-organisme TLR / profil cytokinique

MICRO-ORGANISME

Probiotiques (Bactéries lactiques)

ADN de *L. gasseri*

Peptidoglycane Ac. teichoïque Oligo ADN

5'ATTATTATA
3'GACTTAGCT-3'

TLR2 TLR4 TLR9

Membrane cellulaire

APC Cellule dendritique

LyB

Signal de transduction

Production de cytokines

Immuno stimulation

Commutation de Classe

Génération d'IgE lors des infections parasitaires et des allergies

Fig 1- The delicate balance between the Th1/Th2 pattern of immune response. In allergic individuals and in helminth infections there is a Th2-dominated immune reaction with eosinophilia, and hyper IGE, by binding to mast cells. IGE triggers release of mediators associated with pruritus. When activated, Th2 cytokines inhibit the Th1 arm of the immune system. APC = antigen presenting cell; DTH = delayed type hypersensitivity.

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Evolution de la réponse primaire

- **Maturation d'affinité**
- **Commutation de classe**
- **Génération de LyB mémoire ou plasmocytes à durée de vie longue**

EFFICACITE

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Génération des LyB mémoire

- **LyB mémoire:**
 - Générées à partir des centrocytes de haute affinité sélectionnées dans la zone claire des CG
 - Capacité à répondre plus vite et plus vigoureusement lors d'un second contact avec le même Ag
 - Efficacité de la réponse Mémoire:
 - Fréquence >
 - Seuil d'activation <
- **Maintien Mémoire et Protection:**
 - **Maintien de la population mémoire (via division)**
 - Ré-activation rapide à l'Ag
 - **AC plasmatiques recirculants**
 - Activation régulière des B mem ou persistance de plasmocytes sécrétant des AC
 - Rôle persistance Ag sur FDC

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Défaut de génération de cellules mémoire

Ag Thymo-indépendants : (ou Activation des LyB en l'absence de CD40L)

Les molécules impliquées dans ce processus sont généralement des polysaccharides à structure très répétitive

- LPS (lipopolysaccharides bactériens)
- Flagelline (extraite de flagelle de Salmonelle)
- Polysaccharides de pneumocoques
- Ficoll (polymère industriel) = polydestrant utilisé pour séparer les lymphocytes sanguins par centrifugation car sa densité > celle des lymphocytes)

Ag Thymo-dépendants

Réponse I ⇒ IgM et IgG décalés dans le temps = commutation de classe.

Réponse II ⇒ pas de commutation de classe.

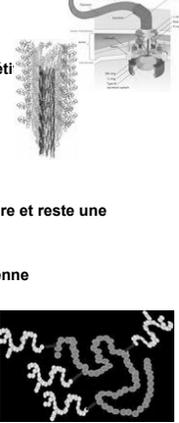
Ideé de la mémoire immunitaire : lors de la première injection, l'organisme a constitué des clones-mémoires. Cette mémoire est attribuée aux lymphocytes T mais il existe des L.B. mémoires.

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÄT
B. Bellier

Ag thymo-indépendants et infections microbienne

- **Flagelline bactérienne (protéine)**
- **Polysaccharides bactériens: structures glucidiques répétitives**
 - Immunisation difficile
 - Réponse primaire courte,
 - de faible amplitude,
 - à IgM,
 - sans cellules mémoire
- **Lors d'une nouvelle infection : pas de réponse secondaire et reste une réponse IgM**
- **Conséquences:** Handicape pour la réponse anti-bactérienne
- **Application:** développement de vaccins conjugués



Vaccin Quimi-Hib développé par l'équipe de René Roy et Vicente Verez Bencomo. En blanc, la partie synthétique (le polysaccharide). En rouge, au centre, la protéine du tétanos (source: René Roy)

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÄT
B. Bellier

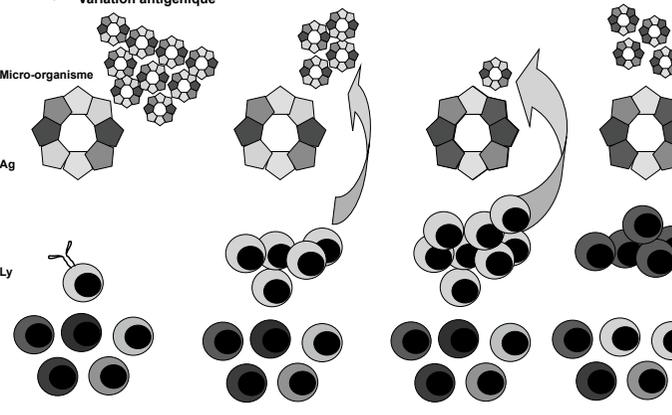
III. Echappement des micro-organismes à la réponse humorale

Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÄT
B. Bellier

Mécanisme d'échappement des micro-organismes à la réponse anticorps

- **Variation antigénique**

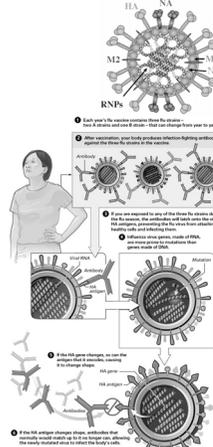


Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÄT
B. Bellier

Mécanismes d'échappement Cas de l'infection grippale

- **Influenza :** *Orthomyxoviridae*; Virus à ARN; espèces A, B, C
- **Influenza A :** plusieurs sous-types définis par Ag de surface:
 - H : hémagglutinine (HA) : 15 types
 - N : neuraminidase (NA) : 9 types
 - Ex de sous-types : H3N2, H1N1, H7N7, H5N1 ...
- **Le virus de la grippe n'est pas antigéniquement stable :**
 - Modifications mineures (antigenic drift = Dérive antigénique)
Les modifications mineures (mutation des protéines NA et HA) surviennent au cours de chaque épidémie. Ces modifications modifient la séquence du génome viral mais ne définissent pas un nouveau sous-type viral.
>> nouveaux variants >> épidémies
 - Modifications majeures (antigenic shift = Cassure antigénique)
Modifications majeures résultent de la recombinaison avec d'autres virus
L'arrivée d'un nouveau variant provoque le plus souvent une épidémie
>> nouvelles espèces >> pandémies



Bertrand Bellier – DES Cambridge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Grippe saisonnière et grippe aviaire Epidémie versus pandémie

- Epidémie:**
 - Chaque hiver, infection par A/H1N1, A/H3N2, B (grippe saisonnière)
 - Variation chaque année
 - Immunité plus ou moins efficace : protection croisée contre nouveaux variants (**mutants**)
- Pandémie**
 - Nouvelle souche
 - Issu d'un réservoir animal :oiseaux sauvages = grippe aviaire
 - Aucune immunité pré-existence contre les **recombinants**

H5N1: Risques de pandémie

- H5N1 peut infecter l'homme (cas humains en Asie) = Zoonose
- mais pas adapté (faible réplication virale)
- pas de transmission d'homme à homme (ou limitée)

Risque élevé de pandémie en cas de « shift » = « cassure antigénique »

- Réassortiment chez un animal:
 - Porc si élevage conjoint du porc et du canard
 - Volailles
 - Passage chez l'homme en cas de contact étroit avec les animaux
- Réassortiment chez l'homme:
 - H5N1 peut passer directement chez l'homme

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Cas de pandémie de grippe aviaire

Epidémies annuelles françaises: virus A ou B ou A puis B:

1995/96:	H1N1: 47%, H3N2: 47%, B: 6%
1996/97:	H3N2: 85%, B: 15%
1998/99:	H3N2: 50%, B: 50%
1999/00:	H3N2: 99%, B: 1%
2000/01:	H1N1: 98%, B: 1%

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Nouvelle Grippe H1N1

- La nouvelle grippe A/H1N1 dite grippe « porcine » ou A(H1N1)2009 est une infection humaine par un virus grippal (H1N1) qui infecte habituellement les porcs.
- Virus différent de la souche H1N1 responsable de la grippe saisonnière
- Aucun vaccin disponible
- Les vaccins existants contre la grippe saisonnière ne confèrent pas de protection.
- Délai de 6 mois minimum

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Anticorps et immunité humorale : Conclusions

- Développement RIH:**
 - RIH contre Ag protéique (thymo-dépendant) requiert T helper: Coopération cellulaire
 - Nécessite co-stimulation via CD40L
 - Induit CG, mutation somatique, commutation classe et B mémoire
 - CG: 90% meurent par sélection sur FDC, centrocytes sélectionnés donnent mem + Plasmome
 - Différences quantitatives et qualitatives entre RIH I et RIH II
- Action des AC:**
 - Agglutination (IgM)
 - Neutralisation Ag (IgG, vaccin, IgA)
 - Augmente phagocytose (IgG+M; opsonisation)
 - Activation du complément (IgG+M)
 - Renforce RIC : ADCC
- RI antivirale, antibactérienne et anti-parasitaire**

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

UPMC
UNIVERSITÉ PARIS UNIVERSITÉS
B. Bellier

Mécanismes de défense (schématique)

	Phagocytose	Immunité humorale		Immunité cellulaire
	Polynucléaires et macrophages	Complément	Anticorps	Lymphocytes T
Bactéries				
- entérobactérie	+++	++	+++	-
- mycobactérie	-			+++
Champignons				
- <i>Candida/Aspergillus</i>	+++	-	-	++
- <i>Cryptococcus</i>	++	-	-	++
Parasites				
Protozoaires	+	+	+	+++
Virus			++	+++

Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009